

**Gelchromatographischer Nachweis
von löslichen Fibrinmonomerkomplexen (SFMC)**

**Vereinfachung der Methode
unter Verwendung von radioaktiv markiertem Fibrinogen**

Andrea Zimmermann

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. E. Deutsch)

Gelchromatographischer Nachweis
von löslichen Fibrinmonomerkomplexen (SFMC).
Vereinfachung der Methode
unter Verwendung von radioaktiv markiertem Fibrinogen.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Andrea Zimmermann
aus
Köln
1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Deutsch

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Marx

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 6. 1978

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

1. Auftreten und bisher übliche Nachweismethoden von SFMC
2. Kurze Vorbemerkungen zur Physiologie und Pathophysiologie der intravasalen Blutgerinnung
3. Fragestellung dieser Arbeit

II. Material

III. Methoden

IV. Ergebnisse

- V. Verzeichnis und Abbildungen aller durchgeführten Versuche

VI. Diskussion

VII. Zusammenfassung

VIII. Literaturverzeichnis



In dieser Arbeit verwendete Abkürzungen:

125-J cpm	counts pro Minute von 125-J, im Szintillationszähler mit NaJ-Bohrlochkristall gemessen
E ₂₈₀ nm	Extinktion der eiweißhaltigen Probe, bestimmt bei der Wellen- länge 280 nm
FM	Fibrinmonomere
SFMC	lösliche Fibrinmonomerkomplexe
TRCHII	tanned red cell haemagglutination inhibition immuno assay
Tris Puffer	Tris-hydroxymethyl-aminomethan- Puffer, 0,06 M; ph 7,6
PAP	plättchenarmes Plasma

1. Auftreten von SFMC und bisher übliche Nachweismethoden.

Der Nachweis eines pathologisch aktivierten, intravasalen Gerinnungsvorganges ist besonders bei klinisch noch asymptomatischen Fällen von z.B. chronischer Verbrauchskoagulopathie bei Karzinompatienten oder massiver tiefer Venenthrombose bei bettlägerigen, postoperativen Patienten wegen der therapeutischen Konsequenzen von größter Bedeutung.

Der schlüssigste Beweis für das Vorliegen einer pathologischen Aktivierung des Gerinnungssystems ist der Nachweis einer intravasalen Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin.

Dafür stehen uns heute folgende Methoden zur Verfügung:

I. Indirekte Methoden.

Nachweis einer verminderten Fibrinogenkonzentration in Verbindung mit verringerter Thrombozytenzahl und dem Auftreten von Fibrin/Fibrinogenspaltprodukten als Ausdruck einer sekundär einsetzenden Fibrinolyse. Zusätzlich findet sich meist auch eine verminderte Faktor XIII - Konzentration neben einer Verminderung verschiedener anderer Gerinnungsfaktoren und Antithrombin III (24,25).

II. Direkte Methoden.

a) relativ spezifische, technisch einfache Methoden:

Nachweis von SFMC durch ein Paracoagulationsphänomen, wie z.B. mit dem Äthanoltest nach Godal (16,30). Diese Methoden ergeben gelegentlich sowohl falsch positive als auch falsch negative Resultate (2).

b) spezifische Methoden:

Nachweis von Fibrinmonomeren (FM) in Form löslicher Fibrinmonomerkomplexe mittels Gelchromatographie oder der Nachweis von Fibrinopeptiden mittels Radioimmunoassay (13,47,48).

Der Nachteil der letztgenannten Methoden liegt in ihrer Aufwendigkeit sowohl was die aufzuwendende Zeit als auch die technische Durchführung betrifft. Ein spezieller Nachteil des Fibrinopeptidnachweises liegt in ihrer kurzen Plasmahalbwertszeit von nur 3 Stunden (56), wodurch etwas länger zurückliegende Episoden intravasaler Gerinnung schlechter erfaßt werden können, als mit dem Nachweis von SFMC, welche eine Plasmahalbwertszeit von 13 Stunden aufweisen (56).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, eine vereinfachte gelchromatographische Nachweismethode von SFMC zu entwickeln.

Das Prinzip besteht in einer Markierung der SFMC mit ¹²⁵-J Fibrinogen vor der Gelchromatographie. Es entfällt daher die bisher übliche zeitraubende immunologische Bestimmung der SFMC im Eluat.

2. Kurze Vorbemerkungen zur Physiologie und Pathophysiologie der intravasalen Blutgerinnung.

Bevor näher auf die nowendigen Fragestellungen eingegangen wird, soll kurz die Physiologie und Pathophysiologie der intravasalen Gerinnung gestreift werden (29,38,52).

Man unterscheidet drei Phasen der Gerinnung.

Die erste kann man als Vorphase der Prothrombinaktivierung bezeichnen. Sie erfolgt auf zwei Wegen. Der eine Weg verläuft über das endogene System und wird an blutfremden Oberflächen, wie freiliegendem Kollagen oder Endotheldefekten, ausgelöst. Beteiligt sind die Faktoren XII, XI, IX, VIII, Plättchenfaktor 3 und Calcium.

Im exogenen System wird der Gerinnungsvorgang durch Freisetzung von Gewebethrombokinase und damit Aktivierung von Faktor VII ausgelöst.

Die zweite Phase wird als gemeinsame Endstrecke beider Systeme bezeichnet. In ihr erfolgt über die Aktivierung von Faktor X unter Mitbeteiligung von Plättchenfaktor 3, Faktor V und Calcium die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin.

In der dritten Phase werden durch Thrombin vom Fibrinogenmolekül wie Fibrinopeptide A und B proteolytisch abgespalten. Die dadurch entstehenden Fibrinmonomere (FM) polymerisieren spontan über noch lösliche Oligomere zu einer unlöslichen, vorerst aber noch sehr instabilen Fibringerinnung aus. Im Prinzip jedoch können FM auch mit nativem Fibrinogen sowie größeren Fibrinogenspaltprodukten zu löslichen Fibrinmonomerkomplexen (SFMC) copolymerisieren (2,3,45,54,58). In welchem Ausmaß diese entstehen, ist von den Mengenverhältnissen der an der Komplexbildung beteiligten Reaktionspartner zueinander abhängig (5,53).

Durch Einwirkung von Faktor XIII wird das Fibringerinnung schließlich durch chemische Quervernetzung stabilisiert.

Es können aber ebenso auch noch lösliche Fibrinpolymere, SFMC und Fibrinogenmoleküle untereinander durch Faktor XIII quervernetzt werden (37).

Als sekundäre Folge des Gerinnungsprozesses kann das fibrinolytische System aktiviert werden. Es entsteht Plasmin, das Fibrin proteolytisch zu Fibrinospaltprodukten verschiedener Größe abbaut. In geringerem Maße wird auch Fibrinogen durch Plasmin gespalten (52). Von verschiedenen Autoren wurde die Vorstellung eines physiologischerweise im Organismus ablaufenden, ständigen, aber in seiner Auswirkung latenten Gerinnungsvorganges entwickelt (32,36,59). Das hämostatische Gleichgewicht und die Eukoagulabilität des Blutes werden durch körpereigene Kompensationsmechanismen aufrechterhalten (32).

Den wichtigsten regulierenden Faktor stellen die physiologischen Inhibitoren der plasmatischen Blutgerinnung dar, und zwar Antithrombin III, alpha 2 Makroglobulin und eventuell andere, bisher noch weniger definierte Inhibitoren (52,59).

Die RES-Clearance entfernt sowohl Zwischen- und Endprodukte der Gerinnung wie SFMC, FM, und Fibrin/Fibrinogenspaltprodukte als auch Stoffe, die selbst aktivierend wirken wie bakterielles Endotoxin, hämolysierte Erythrozyten, Antigen-Antikörper-Komplexe und Lipide aus der Zirkulation (7,15,50,62). Einen weiteren wichtigen Regulationsmechanismus stellt das fibrinolytische System dar (36,50).

Intravasale Gerinnungsprozesse, bei denen man im allgemeinen SFMC nachweisen kann, können sowohl disseminiert als auch lokalisiert ablaufen. Im ersten Fall spricht man von einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) oder Verbrauchskoagulopathie, da Gerinnungsfaktoren aufgebraucht werden und infolgedessen ein Hämostasedefekt entsteht, während es sich im zweiten Fall um massive venöse Thrombosen handelt.

Die DIC kann zum einen aus einem bereits bestehenden Zustand der Hyperkoagulabilität resultieren, wenn die Homöostase durch absolute oder relative Insuffizienz der Kompensationsmechanismen nicht mehr gewährleistet ist.

Nach Marx spricht man von einer Hyperkoagulabilität, wenn eine quantitative Zunahme von gerinnungsfördernden Faktoren des Plasmas oder eine Abnahme von Inhibitoren der Gerinnung nachzuweisen ist (Hyperkoagulabilität I. Grades) oder wenn bereits aktivierte Gerinnungsfaktoren gefunden werden können (Hyperkoagulabilität II. Grades) (41). Zum anderen kann auch bei nicht hyperkoaglem Zustand des Gerinnungssystems etwa durch Einschwemmung thromboplastischer Substanzen aus zerfallenden Gewebszellen oder durch bakterielles Endotoxin ein disseminierter intravasaler Gerinnungsprozeß ausgelöst werden (12,44,50,49).

3. Fragestellung.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu überprüfen, ob radioaktiv markiertes Fibrinogen, das mit SFMC-haltigem Patientenplasma inkubiert wird, in diese SFMC nachträglich in vitro eingebaut werden bzw. sich an noch freie FM oder Fibrinoligomere anlagern kann. Wenn das der Fall wäre, könnten sich die nunmehr markierten SFMC nach gelchromatographischer Auftrennung des Plasmas durch einfache Ausmessung der Fraktionen im Szintillationszähler schnell und sicher qualitativ und möglicherweise quantitativ bestimmen lassen.

Um diese Möglichkeiten zu überprüfen, mußten folgende Fragen geklärt werden :

1. Ist kommerziell erhältliches, radioaktiv markiertes Fibrinogen genügend rein und stabil, so daß es gelchromatographisch in einem einheitlichen Gipfel eluiert werden kann ?

2. Verhält sich das radioaktiv markierte Fibrinogenpräparat nach Thrombinzusatz wie natives Fibrinogen ?

3. Bilden aus gereinigtem Fibrinogen hergestellte FM mit dem markierten Fibrinogen Komplexe ?

4. Lagert sich markiertes Fibrinogen auch an SFMC an, die in Normalplasma in vitro hergestellt wurden ?

II. Material

1. Gelchromatographie

- a) Biogel A-5m^R (200-400 mesh), Bio-Rad Laboratories
Richmond, USA
- b) Tris Puffer, bestehend aus 29 g Tris/ 4 Liter Aqua dest.
und 35 g bzw. 70 g bzw. 93,3 g bzw 140 g NaCl/4 Liter
zur Herstellung eines 0,06 molaren Tris Puffers mit
einem NaCl-Zusatz von 0,15 bzw. 0,3 bzw. 0,4 bzw. 0,6 M/l,
ph 7,8.
- c) Blue Dextran 2000, Pharmacia Fine Chemicals,
Uppsala, Schweden

2. Herstellung von SFMC in vitro

- a) Plasma: Sowohl zur SFMC-Herstellung als auch für die
zugehörigen Kontrollen wurde Blut von klinisch gesunden
Personen entnommen, im Verhältnis 1:10 mit 3,8 %iger
Trinatriumzitratlösung versetzt und zentrifugiert.

Zur Markierung von SFMC in Patientenplasma wurde von
zwei Patienten, die im Rahmen eines metastasierenden Ovarial-
carcinoms bzw. einer akuten Promyelozytenleukämie eine
DIC entwickelt hatten, Blut entnommen, im Verhältnis 1:10
mit 3,8 %iger Trinatriumzitratlösung versetzt und zentri-
fugiert.

- b) Fibrinogen Kabi^R, AB Kabi, Stockholm, Schweden
- c) 125-J Fibrinogen der Fa. Amersham, Buckingham, England.
Spezifische Aktivität ca. 100 Mikocurie 125-J / mg Fibri-
nogen, lyophilisiert, zu 90 % gerinnbar.
- d) Antithrombin Reagens Roche, Hoffmann la Roche, Basel, Schweiz
Ampulle a 16 NIH
- e) Trasylol^R, Fa. Bayer, Leverkusen, Deutschland
10 000 KIE / ml
- f) Heparin novo, Novo Industri A/S Kopenhagen, Dänemark
5000 E / ml
- g) Trinatriumzitratlösung 3,8 %
- h) Monojodazetat, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

3. Reagenzien zum Merskey Test (TACHII)

- a) Antifibrinogenserum vom Kaninchen
Behringwerke, Marburg/Lahn, Deutschland
- b) Fibrinogenstandardlösung (10 000 µg/ml), hergestellt
aus Fibrinogen Kabi^R, AB Kabi, Stockholm, Schweden

- c) Albuminpuffer 2 %, hergestellt aus gereinigtem, lyophilisiertem Rinderalbumin
- d) Erythrozyten der Blutgruppe 0 , rhesusnegativ, lyophilisiert, tanninisiert, mit Fibrinogen Beladen, in 0,25 %igem Albuminpuffer
- e) Phosphatpuffer 0,15 M, pH 6,47

4. Reagentien zur FM-Herstellung

- a) Topostasin Roche ^R , Hoffmann la Roche, Basel, Schweiz
3000 NIH
- b) Na-EDTA 5 % , pH 6,2
- c) Essigsäure 0,1 % , pH 3,27
- d) NatriumazetatLösung 0,3 M, pH 8,47

5. Reagentien zur Durchführung der Biuretreaktion

Reagens A : CuSO_4

K-Na Tartrat, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Reagens B : Na-Desoxycholat, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

6. Geräte

- a) Chromatographiesäulen 80 x 2,6 cm,
Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
- b) Fraktionskollektor : LKB Bromma 7000 Ultrorac Fraction Collector
- c) Pumpe: Zero Max Drive Power Block,
The Zero Max Company, Minneapolis, USA
- d) Szintillationszähler : NaJ(Tl) Kristall
- e) Photometer : Beckmann Spectrometer DB
- f) Zentrifuge : Hettich Roto Silenta II,
Schleuderradius 21 cm
- g) Ultrahülsen Nr. 100, Carl Schleicher und Schüll

III. Methoden

1. Gelchromatographie

Zur Chromatographie wurde Biogel A-5m benutzt, dessen Auftrennungsvermögen für globuläre Proteine im Bereich der Molekulargewichte zwischen 80 000 und 5 000 000 annähernd linear ist. Der Innendurchmesser der 80 cm langen Säulen betrug 2,6 cm. Zur Äquilibration des Gels und Elution der Proben diente 0,06 M Tris Puffer mit einem pH von 7,8 und 0,3 M NaCl/ Liter. In den Versuchen, in denen eine davon abweichende NaCl-Konzentration verwendet wird, wird gesondert darauf hingewiesen.

Die Auftragsmenge der zu untersuchenden Proben betrug bei allen Versuchen 3 ml, ebenso das Volumen der nach Chromatographie erhaltenen Fraktionen. Das Durchfließvolumen betrug 0,65 ml/ min. Sämtliche Versuche wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Zu den Versuchen, in denen SFMC in vitro hergestellt wurden, wurden sofortige Kontrollchromatographien durchgeführt. Dazu wurde Normalplasma mit 125-J Fibrinogen versetzt und chromatographiert.

Um das Elutionsvolumen V_e der hochmolekularen SFMC genau festlegen zu können, wurde das Ausschlußvolumen V_0 der Biogel A-5m Säule mittels Dextranblau 2000 bestimmt, und zusätzlich die Elutionsvolumina von 125-J Fibrinogen und Albumin festgelegt.

2. Reinigung und Stabilisierung des kommerziellen 125-J Fibrinogenpräparates.

Es wurde ein lyophilisiertes 125-J Fibrinogenpräparat der Fa. Amersham mit einer Aktivität von 100 Mikrocurie in 3 ml eines 0,06 M Tris Puffers (pH 7,8) mit einem Zusatz von 0,3 M NaCl gelöst und auf Biogel A-5m aufgetragen.

Zur Elution diente der gleiche Puffer. Nach Ausmessung der Fraktionen im Na-J Szintillationszähler wurde die in Abb.1 a mit vertikalen Linien gekennzeichneten Fraktionen mit Hilfe von Ultrahülsen unter negativem Druck konzentriert und auf Biogel A-5m rechromatographiert.

Derselbe Versuch wurde unter den Bedingungen höherer Ionenstärke (0,06 M Tris Puffer, 0,6 M NaCl-Zusatz, pH 7,8) bei sonst gleichen Verhältnissen durchgeführt. Mit Ultrahülsen konzentriert wurden hier die in Abb.1 c mit vertikalen Linien gekennzeichneten Fraktionen.

3. Auswertung der gelchromatographierten Fraktionen.

Nach Ausführung der Gelchromatographie bestand die erste Untersuchung in einer Ausmessung der Fraktionen in einem Na-J Szintillationszähler, um die Verteilung des markierten Fibrinogens in den Fraktionen feststellen zu können. Anschließend wurde die optische Dichte als Parameter des Proteingehaltes in einem Beckmann Spectrophotometer bei 280 nm gemessen. Im letzten Schritt wurden das Fibrinogen und die Fibrinogenderivate wie SFMC mittels des TACHII nach der Methode von Merskey immunologisch quantitativ bestimmt [42].

4. Blutabnahmetechnik und Gewinnung von thrombozytenarmem Plasma.

Kurz nach Anlegen einer nur geringen Stauung am Oberarm wurden nach sauberer Venenpunktion mit dicker Nadel die ersten 2-3 ml Blut verworfen. Neun ml Blut wurden mit 1 ml 3,8%igem Trinatriumzitrat in einem Plastikröhrchen sofort gut durchmischt und mit 0,1 ml Aprotinin (Trasylo^R, 10 000 KIE/ ml) versetzt. Die Zugabe von Aprotinin erfolgte, um eine bestehende fibrinolytische Aktivität bzw. Aktivierung des fibrinolytischen Systems und damit das nachträgliche Auftreten von Fibrin/Fibrinogenspaltprodukten zu verhindern.

Unmittelbar anschließend wurde das Blut über 15 Minuten bei 3000 g zentrifugiert und das überstehende plättchenarme Plasma abgehoben.

5. Herstellung von SFMC in plättchenarmem Plasma (PAP) nach der Methode von Müller-Berghaus (45).

Vier ml dieses plättchenarmen, Aprotinin enthaltenden Plasmas wurden nach Zusatz von 0,2 ml einer Thrombinlösung (3 NIH E/ml) 15 min bei 37 Grad C inkubiert und das entstandene Gerinnsel entfernt.

Nach Wiederholung dieses Vorganges wurde mit 0,2 ml einer 100 E/ml enthaltenden Heparinlösung die Thrombinwirkung unterbrochen. Bevor 3 ml zur Gelchromatographie auf die Säule aufgetragen wurden, wurde das SFMC-haltige Plasma noch weitere 60 min bei 37 Grad C inkubiert. Um die Vollständigkeit der Neutralisation von Thrombin durch Heparin/Heparincofaktor zu überprüfen, wurde der Rest des SFMC-haltigen Plasmas über Nacht bei 37 Grad C weiterinkubiert und auf neuerliche Gerinnselbildung kontrolliert. Eine solche konnte nie gefunden werden. Auch erneuter Zusatz von 0,2 ml einer 16 NIH E/ml enthaltenden Thrombinlösung führte zu keiner neuerlichen Gerinnselbildung.

6. Herstellung 125-J Fibrinogen-markierter SFMC in Normalplasma.

In der Versuchsanordnung, in der gezeigt werden sollte, daß sich 125-J Fibrinogen bei der Entstehung von SFMC in Plasma gleichartig wie natives Fibrinogen verhält, wurde ca.

1 Mikrocurie 125-J Fibrinogen vor der Anwendung der oben beschriebenen Methode nach Müller-Berghaus dem Plasma zugesetzt.

7. Herstellung von Fibrinmonomeren (FM).

FM wurden nach einer Modifikation der Methoden von Belitser(5) und Müller-Berghaus (46) in Plasma hergestellt.

Zu 10 ml Zitratplasma (1:10) wurden 10 ml einer Lösung zugefügt, die sich wie folgt zusammensetzte:

0,50 ml 5%ige EDTA (ph 6,2)
0,25 ml Aprotinin (10 000 E/ml)
2,00 mg Monojodazetat

ad 10,00 ml mit physiologischer Kochsalzlösung

Nach der folgenden Zugabe von 100 NIH E Thrombin wurde das Gemisch 40 - 60 min bei 37 Grad C Inkubiert und das entstandene Gerinnsel mit einem aufgerauhten Glasstab entfernt und ausgedrückt.

Nachdem das Gerinnsel 5mal in je 10 ml einer 0,025 % EDTA enthaltenden physiologischen Kochsalzlösung gewaschen worden war, wurde es in 5 ml 0,1 %iger Essigsäure (0,01583 n, ph 3,27) durch Schwenken aufgelöst und dann in 5 ml 0,3 M Natriumazetat (40,824 g/l, ph 8,47) auspolymerisiert. Das Gerinnsel wurde wieder mit einem Glasstab entfernt, ausgedrückt, in 5 ml 0,1 %iger Essigsäure gelöst und in 5 ml 0,3 M Natriumazetat wieder auspolymerisiert.

Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Nach neuerlicher Lösung in 0,1 %iger Essigsäure wurde die so erhaltene FM-Lösung nach Bestimmung des Proteingehaltes mittels der Biuret-methode bis zur weiteren Verwendung bei 4 Grad C aufbewahrt.

8. Herstellung von SFMC aus gereinigtem Fibrinogen und FM
(Versuch a)
und Versuch zur Austauschbarkeit von in SFMC gebundenem (markiertem) und freiem Fibrinogen (Versuch b).

Zu Versuch a)

Erster Schritt:

zu 0,75 ml FM-Lösung (0,05 mg/ml in 0,1%iger Essigsäure) wurden
0,20 ml 125-J Fibrinogen
(in 0,06 M Tris Puffer ph 7,8; 0,6 M NaCl)
und
1,30 ml einer Lösung, bestehend aus
0,75 ml 0,3 M Natriumazetat und
1,50 ml Fibrinogen (Kabi) in Zitratpuffer (ph 6,8)
(enthaltend: NaCl 0,4 g
Na-Zitrat 1,0 g
Zitronensäure 0,2 g
dest. Wasser auf 100 ml)

hinzugefügt und 13 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert.

Das entstandene Gerinnsel wurde entfernt und 2 ml des Überstandes entnommen.

Zweiter Schritt:

Zu diesen 2 ml wurden 1,15 ml Zitratpuffer (ph 6,8; Zusammensetzung s.o.) zugesetzt und nach erneuter Inkubation 3 ml davon auf die Biogel A-5m Säule aufgetragen und mit Tris Puffer chromatographiert.

Zu Versuch b)

Der erste Schritt erfolgte wie unter Versuch a) beschrieben. Nach 13-stündiger Inkubation wurde das Gerinnsel entfernt und 2 ml des Überstandes entnommen.

Im zweiten Schritt wurde zu diesen

2,00 ml Überstand +)

1,15 ml Fibrinogenlösung ++)

bestehend aus 0,75 ml Zitratpuffer und
1,50 ml Fibrinogen (500 mg% , in Zitratpuffer)

hinzugefügt. Nach Inkubation von 2 Stunden, während der keine neuerliche Gerinnselbildung auftrat, wurden 3 ml davon chromatographiert.

Die Versuche a) und b) wurden parallel ausgeführt.

+) Diesen 2 ml entsprechen 3,82 mg Fibrinogen vor Entfernen des Gerinnsels.

++) Diese 1,15 ml enthalten 3,82 mg Fibrinogen.

9. Einbau von markiertem Fibrinogen in bereits bestehende SFMC

a) in gereinigtem System,

b) in plättchenarmem Plasma (PAP).

Zu a) In 4 ml einer 400 mg%igen Fibrinogenlösung (in Zitratpuffer ph 6,8; Zusammensetzung s.o. unter Punkt 8 a) wurden nach Müller-Berghaus (s. Punkt 5) SFMC hergestellt. Nach Unterbrechung der Thrombinwirkung durch 0,2 ml heparinisiertes Serum (100 E Heparin / ml Serum, das Serum diente als Quelle für Heparincofaktor) wurden

ca. 1 Mikrocurie 125-J Fibrinogen zugesetzt und die Mischung 1 Stunde bei 37 Grad C inkubiert. Davon wurden anschließend 3 ml auf Biogel A-5m chromatographiert.

Zu b) Bei dieser Versuchsanordnung wurden nach der Methode von Müller-Berghaus (s. Punkt 5) in 4 ml PAP SFMC hergestellt und diesen nach Unterbrechung der Thrombinwirkung durch Heparin ca. 1 Mikrocurie 125-J Fibrinogen zugesetzt. Das Plasma wurde anschließend 1 Stunde bei 37 Grad C Inkubiert und danach auf der Biogel A-5m Säule chromatographiert.

10. Markierung von SFMC in Patientenplasma.

Zwei klinisch gesunden Personen sowie zwei Patienten mit Verbrauchskoagulopathie und positivem Äthanoltest wurde nach der unter Punkt 4) beschriebenen Technik Blut durch Venenpunktion entnommen.

Die Grundkrankheit bei Patientin "A" war ein metastasierendes Ovarialkarzinom, bei dem Patienten "B" eine akute Promyelozytenleukämie.

Außer Aprotinin wurde dem Zitratblut noch 0,2 ml Heparin (100 E/ml) vor der Zentrifugation zugesetzt. Je 4 ml des PAP wurden entnommen und mit ca. 1 Mikrocurie 125-J Fibrinogen versetzt. Nach Inkubation von 60 min bei 37 Grad C wurden 3 ml davon auf die Biogel A-5m Säule aufgetragen und mit Tris Puffer eluiert.

IV. Ergebnisse

1. Stabilisierung von kommerziellem 125-J Fibrinogen nach gelchromatographischer Abtrennung von Fibrinogenaggregaten.

- a) Bei Chromatographie von 125-J Fibrinogen der Fa. Amersham auf Biogel A-5m fand sich hochmolekulares Fibrinogenmaterial im Ausschlußvolumen und in geringerem Maße in einer Schulter zwischen diesem und dem Fibrinogengipfel (Abb. 1 a). Es wurden daher die in Abb. 1a durch vertikale Linien gekennzeichneten Fraktionen des Fibrinogenpeaks konzentriert und anschließend in gleicher Weise rechromatographiert, um ein gelchromatographisch einheitliches Fibrinogen zu erhalten.

Dabei zeigte es sich aber, daß neuerlich hochmolekulares Fibrinogenmaterial aufgetreten war, (Abb. 1 b).

- b) Ähnlicherweise fand sich hochmolekulares Fibrinogenmaterial vor dem Fibrinogenpeak, wenn 125-J Fibrinogen derselben Charge in Tris Puffer mit 0,6 M NaCl-Zusatz gelöst und rechromatographiert wurde (Abb. 1c).

Die in Abb. 1c mit vertikalen Linien gekennzeichneten Fraktionen des Fibrinogenpeaks wurden wieder konzentriert und nach verschieden langer Lagerung in Tris Puffer mit 0,6 M NaCl-Zusatz bei 4 Grad C im selben Puffersystem rechromatographiert. Die Abb. 1d und 1e zeigen deutlich, daß unter den Bedingungen höherer Ionenstärke nun hochmolekulares Fibrinogenmaterial selbst nach Lagerung von 12 (Abb. 1d) bzw. 72 Tagen (Abb. 1e) kaum mehr auftritt.

In den folgenden Versuchen wurde daher nur eine durch Chromatographie bei hoher Ionenstärke (0,6 M NaCl enthaltender Tris Puffer) nachgereinigtes und stabilisiertes 125-J Fibrinogen verwendet.

2. Herstellung von ^{125}J Fibrinogen markierten SFMC in Normalplasma.

In Normalplasma, das mit markiertem Fibrinogen versetzt war, wurden nach der Methode von Müller-Berghaus SFMC hergestellt. Diese erscheinen mit dem Ausschlußvolumen als symmetrischer Peak (Abb. 2, Versuch).

Die immunologische Bestimmung von Fibrinogenderivaten in den Fraktionen ergibt einen der Radioaktivitätskurve entsprechenden Verlauf.

Im Vergleich dazu finden sich bei der Chromatographie des Kontrollplasmas, welches bis auf den Thrombinzusatz gleich behandelt wurde, nur geringste Mengen hochmolekularen Fibrinogenmaterials unmittelbar hinter dem Ausschlußvolumen (Abb. 2, Kontrolle).

3. Herstellung von SFMC aus gereinigtem ^{125}J Fibrinogen und Fibrinmonomeren.

Abb. 3 zeigt das Ergebnis der Gelchromatographie von SFMC, welche aus ^{125}J Fibrinogen und Fibrinmonomeren hergestellt wurden. Das sowohl durch Radioaktivitätsmessung wie durch immunologische Fibrinogenbestimmung erhaltene Gelchromatogramm entspricht dem Elutionsverhalten der nach Müller-Berghaus in Plasma hergestellten SFMC.

4. Versuch zur Austauschbarkeit von in SFMC gebundenem (markiertem) und freiem Fibrinogen.

In diesem Versuchsansatz, welcher parallel und prinzipiell gleichartig durchgeführt wurde wie der vorhergehende Versuch, wurde als einziger Unterschied die resultierende ^{125}J -SFMC - lösung mit nicht markiertem Fibrinogen statt mit Zitratpuffer inkubiert.

Der Vergleich der Ergebnisse dieses Versuches mit dem vorherigen zeigt, daß es zu keiner Abnahme des Radioaktivitätspeaks im Ausschlußvolumen kommt (Abb. 4).

Entsprechend dem Zusatz nicht markierten Fibrinogens konnte mit der immunologischen Fibrinogenbestimmung insgesamt mehr Fibrinogenmaterial nachgewiesen werden.

5. Einbau von markiertem Fibrinogen in bereits bestehende SFMC

- a) in gereinigtem System,
- b) in plättchenarmem Plasma.

Zu a) Nach Inkubation von 125 -J Fibrinogen mit einer SFMC-Lösung, welche nach der Methode von Müller-Berghaus in gereinigtem Fibrinogen hergestellt worden war, fand sich im Gelchromatogramm ein deutlicher Radioaktivitätspeak im Ausschlußvolumen (Abb. 5a, Versuch).

Mit der immunologischen Methode konnte in den einzelnen Fraktionen kein Fibrinogen bzw. keine Fibrinogen-derivate nachgewiesen werden, da das meiste Fibrinogen nach Thrombinzusatz mit dem Gerinnsel entfernt worden war. Dementsprechend finden sich auch in der photometrischen Ausmessung nur geringste Proteinmengen in den Fraktionen.

Im Kontrollversuch, der prinzipiell gleichartig, jedoch ohne Thrombinzusatz durchgeführt wurde, fehlt der radioaktive Vorpeak im Ausschlußvolumen (Abb. 5a, Kontrolle).

Zu b) In gleicher Weise wie unter Punkt 5a) beschrieben, wurden in PAP SFMC hergestellt und mit 125 -J Fibrinogen inkubiert. (Abb. 5b, Versuch).

Im Vergleich zu der Kontrolle ohne Thrombinzusatz (Abb. 5b, Kontrolle) findet sich wieder ein deutlicher Radioaktivitätspeak im Ausschlußvolumen. Die durch die immunologische Methode erhaltenen Ergebnisse stimmen damit gut überein.

6. Herstellung von SFMC in plättchenarmem Plasma unter gleichzeitiger Hemmung von Faktor XIII-Aktivität und nachfolgender Inkubation mit 125-J Fibrinogen.

Um den Einfluß einer eventuellen Verfestigung der SFMC durch Faktor XIII auf die Markierbarkeit von SFMC mit 125-J Fibrinogen zu untersuchen, wurden SFMC in Anwesenheit von Monojodazetat (1 mg/10 ml physiologische NaCl-Lösung; davon 0,1 ml auf 4 ml PAP), welche die Faktor XIII-Aktivität stark hemmt, hergestellt.

Abb. 6 zeigt, daß die Ausbeute an markierten SFMC dadurch nicht beeinflußt werden konnte.

7. Einfluß der Ionenstärke während der Gelchromatographie auf mit 125-J Fibrinogen markierte SFMC.

Um sicherzustellen, daß die gewählte NaCl-Konzentration von 0,3 M/Liter 0,06 M Tris Puffer (wie sie auch von Fletcher et al. (13) verwendet wird) optimale Bedingungen für die Gelchromatographie von SFMC gewährleistet, wurden in PAP hergestellte und mit 125-J Fibrinogen inkubierte SFMC bei 0,15 M NaCl, 0,4 M NaCl und 0,6 M NaCl/Liter Tris Puffer chromatographiert (Abb. 7, 8, 9).

Aus dem Vergleich der Radioaktivitätspeaks im Ausschlußvolumen ergibt sich, daß sowohl bei 0,15 als auch bei 0,6 M NaCl/Liter Tris Puffer fast keine SFMC im Ausschlußvolumen nachzuweisen sind.

8. Markierung von SFMC in Patientenplasma.

Plasma von zwei Patienten mit gesicherter Verbrauchskoagulopathie und positivem Äthanoltest wurde mit 125-J Fibrinogen inkubiert und über Biogel A-5m fraktioniert (Abb. 10, Versuch, Abb. 11, Versuch).

Unmittelbar darauf wurde zur Kontrolle in gleicher Weise behandeltes Normalplasma chromatographiert (Abb. 10, Kontrolle, Abb. 11, Kontrolle).

Im Elutionsbild der Patientenplasmen fand sich im Vergleich zur Kontrolle vermehrt Radioaktivität im Ausschlußvolumen. Daß es sich hierbei um SFMC handelt, konnte mit Hilfe der immunologischen Fibrinogenbestimmung bestätigt werden.

V. Verzeichnis und Abbildungen aller durchgeführten Versuche.

1. Stabilisierung von kommerziellem 125-J Fibrinogen nach gelchromatographischer Abtrennung von Fibrinaggregaten.

- a) Chromatographie von 125-J Fibrinogen in Tris Puffer mit 0,3 M NaCl-Zusatz.
- b) Rechromatographie von 125-J Fibrinogen in Tris Puffer mit 0,3 M NaCl-Zusatz.
- c) Chromatographie von 125-J Fibrinogen in Tris Puffer mit 0,6 M NaCl-Zusatz.
- d) Rechromatographie von 125-J Fibrinogen in Tris Puffer mit 0,6 M NaCl-Zusatz nach 12-tägiger Lagerung bei 4 Grad C.
- e) Rechromatographie von 125-J Fibrinogen in Tris Puffer mit 0,6 M NaCl-Zusatz nach 72-tägiger Lagerung bei 4 Grad C.

2. Herstellung von 125-J Fibrinogen markierten SFMC in Normalplasma.

Versuch

Plasma

+ Aprotinin

+ 125-J Fibrinogen

+ Thrombin

Inkubation : 15 min bei 37 Grad C

+ Thrombin

Inkubation : 15 min bei 37 Grad C

+ Heparin

Inkubation : 60 min bei 37 Grad C

Ergebnis: Höhe des SFMC-haltigen Vorpeaks (Radioaktivität) in % des Hauptfibrinogenpeaks: 45,70 %.

Kontrolle

Plasma

+ Aprotinin

+ Heparin

+ 125-J Fibrinogen

Inkubation : 90 min bei 37 Grad C

Ergebnis: Höhe des Vorpeaks (Radioaktivität) in % des Hauptfibrinogenpeaks: 3,70 %.

3. Herstellung von SFMC aus gereinigtem ^{125}I -Fibrinogen und Fibrinmonomeren.

Versuch

FM

+ ^{125}I -Fibrinogen

Inkubation: 13 Std. bei Zimmertemperatur

+ Zitratpuffer

Inkubation: 2 Std. bei Zimmertemperatur

Ergebnis: Höhe des SFMC-haltigen Vorpeaks (Radioaktivität)
in % des Hauptfibrinogenpeaks: 8,25 %.

4. Versuch zur Austauschbarkeit von in SFMC gebundenem (markiertem) und freiem Fibrinogen.

Versuch

FM

+ ^{125}I -Fibrinogen

Inkubation: 13 Std. bei Zimmertemperatur

+ "kaltes" Fibrinogen

Inkubation: 2 Std. bei Zimmertemperatur

Ergebnis: Höhe des SFMC-haltigen Vorpeaks (Radioaktivität)
in % des Hauptfibrinogenpeaks: 11,86 %.

S. Einbau von markiertem Fibrinogen in bereits bestehende SFMC
a) in gereinigtem System,
b) in plättchenarem Plasma.

Zu a) Versuch

Fibrinogen

+ Aprotinin

+ Thrombin

Inkubation: 15 min bei 37 Grad C

+ Thrombin

Inkubation: 15 min bei 37 Grad C

+ Heparin *

+ 125-J Fibrinogen

Inkubation: 60 min bei 37 Grad C

Ergebnis: Höhe des SFMC-haltigen Vorpeaks (Radioaktivität)
in % des Hauptfibrinogenpeaks: 6,90 %.

Kontrolle

Fibrinogen

+ Aprotinin

+ Heparin *

+ 125-J Fibrinogen

Inkubation: 90 min bei 37 Grad C

Ergebnis: Höhe des Vorpeaks (Radioaktivität) in % des
Hauptfibrinogenpeaks: 2,60 %.

*) in Humanserum, s.S. 13

Zu b) Versuch

Plasma

+ Aprotinin

+ Thrombin

Inkubation: 15 min bei 37 Grad C

+ Thrombin

Inkubation: 15 min bei 37 Grad C

+ Heparin

+ 125-J Fibrinogen

Inkubation: 60 min bei 37 Grad C

Ergebnis: Höhe des SFMC-haltigen Vorpeaks (Radioaktivität)
in % des Hauptfibrinogenpeaks: 8,3 %.

Kontrolle

Plasma

+ Aprotinin

+ 125-J Fibrinogen

Inkubation: 90 min bei 37 Grad C

Ergebnis: Höhe des Vorpeaks (Radioaktivität) in % des
Hauptfibrinogenpeaks: 5,30 %.

6. Herstellung von SFMC in plättchenarmem Plasma unter gleichzeitiger Hemmung von Faktor XIII-Aktivität und nachfolgender Inkubation mit 125-J Fibrinogen.

Versuch

Plasma

+ Monojodazetat

+ Aprotinin

+ Thrombin

Inkubation: 15 min bei 37 Grad C

+ Thrombin

Inkubation: 15 min bei 37 Grad C

+ Heparin

+ 125-J Fibrinogen

Inkubation: 60 min bei 37 Grad C

Ergebnis: Höhe des SFMC-haltigen Vorpeaks (Radioaktivität) in % des Hauptfibrinogenpeaks: 5,30 %.

Kontrolle

Plasma

+ Monojodazetat

+ Aprotinin

+ Heparin

+ 125-J Fibrinogen

Inkubation: 90 min bei 37 Grad C

Ergebnis: Höhe des Vorpeaks (Radioaktivität) in % des Hauptfibrinogenpeaks: 2,00 %.

7. Einfluß der Ionenstärke während der Gelchromatographie
auf mit $^{125}\text{-J}$ Fibrinogen markierte SFMC.
Chromatographie in Tris Puffer mit 0,15 M NaCl-Zusatz.

Versuch

Plasma

+ Aprotinin

+ Thrombin

Inkubation: 15 min bei 37 Grad C

+ Thrombin

Inkubation: 15 min bei 37 Grad C

+ Heparin

+ $^{125}\text{-J}$ Fibrinogen

Inkubation: 60 min bei 37 Grad C

Ergebnis: Höhe des SFMC-haltigen Vorpeaks (Radioaktivität)
in % des Hauptfibrinogenpeaks: 2,70 %.

Kontrolle

Plasma

+ Aprotinin

+ Heparin

+ $^{125}\text{-J}$ Fibrinogen

Inkubation: 90 min bei 37 Grad C

Ergebnis: Höhe des Vorpeaks (Radioaktivität) in % des
Hauptfibrinogenpeaks: 1,80 %.

8. Einfluß der Ionenstärke während der Gelchromatographie auf mit 125-J Fibrinogen markierte SFMC.
Chromatographie in Tris Puffer mit 0,4 M NaCl-Zusatz.

Versuch Durchführung siehe Punkt 7.

Ergebnis: Höhe des SFMC-haltigen Vorpeaks (Radioaktivität) in % des Hauptfibrinogenpeaks: 6,80 %.

Kontrolle Durchführung siehe Punkt 7.

Ergebnis: Höhe des Vorpeaks (Radioaktivität) in % des Hauptfibrinogenpeaks: 3,20 %.

9. Einfluß der Ionenstärke während der Gelchromatographie auf mit 125-J Fibrinogen markierte SFMC.
Chromatographie in Tris Puffer mit 0,6 M NaCl-Zusatz.

Versuch Durchführung siehe Punkt 7.

Ergebnis: Höhe des SFMC-haltigen Vorpeaks (Radioaktivität) in % des Hauptfibrinogenpeaks: 1,45 %.

Kontrolle Durchführung siehe Punkt 7.

Ergebnis: Höhe des Vorpeaks (Radioaktivität) in % des Hauptfibrinogenpeaks: 1,89 %.

10. Markierung von SFMC in Patientenplasma.

Versuch Patientenplasma (Patientin "A")
 + Aprotinin
 + Heparin
 + 125-J Fibrinogen

Inkubation: 90 min bei 37 Grad C

Ergebnis: Höhe des SFMC-haltigen Vorpeaks in % des
Hauptfibrinogenpeaks: 7,48 %.

Kontrolle Plasma
 + Aprotinin
 + Heparin
 + 125-J Fibrinogen

Inkubation: 90 min bei 37 Grad C

Ergebnis: Höhe des Vorpeaks (Radioaktivität) in % des Haupt-
fibrinogenpeaks: 3,76 %.

Abb.1a
Chromatographie
von ^{125}I -Fibrinogen
in Tris Puffer
mit 0,3 M NaCl-Zusatz

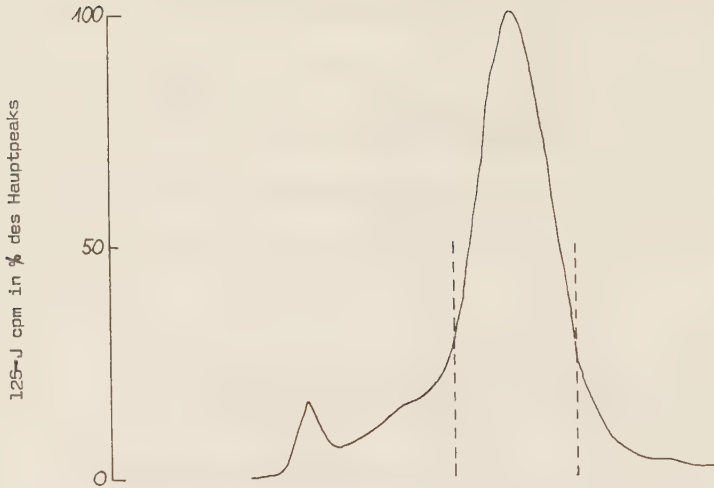
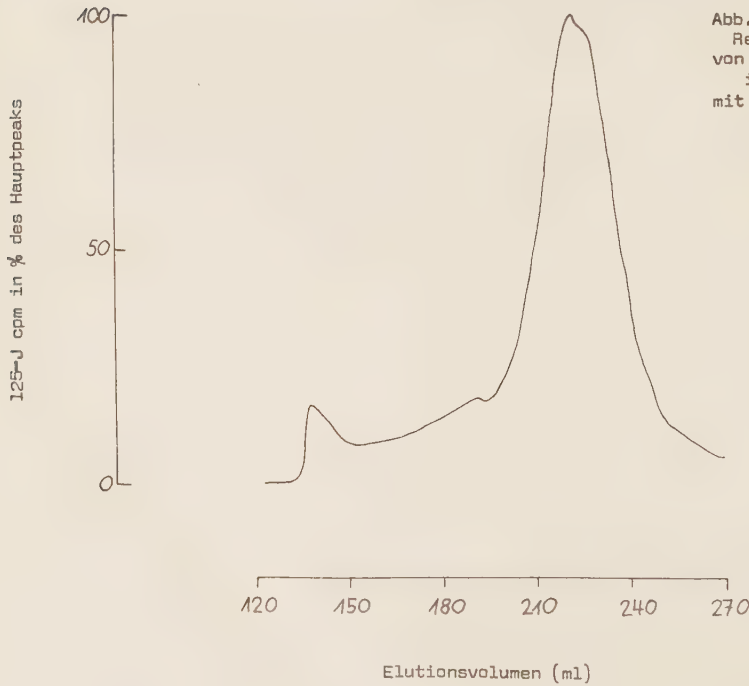


Abb.1b
Rechromatographie
von ^{125}I -Fibrinogen
in Tris Puffer
mit 0,3 M NaCl-Zusatz



11. Markierung von SFMC in Patientenplasma.

Versuch Patientenplasma (Patient "B")

- + Aprotinin
- + Heparin
- + 125-J Fibrinogen

Inkubation: 90 min bei 37 Grad C

Ergebnis: Höhe des SFMC-haltigen Vorpeaks (Radioaktivität)
in % des Hauptfibrinogenpeaks: 3,07 %.

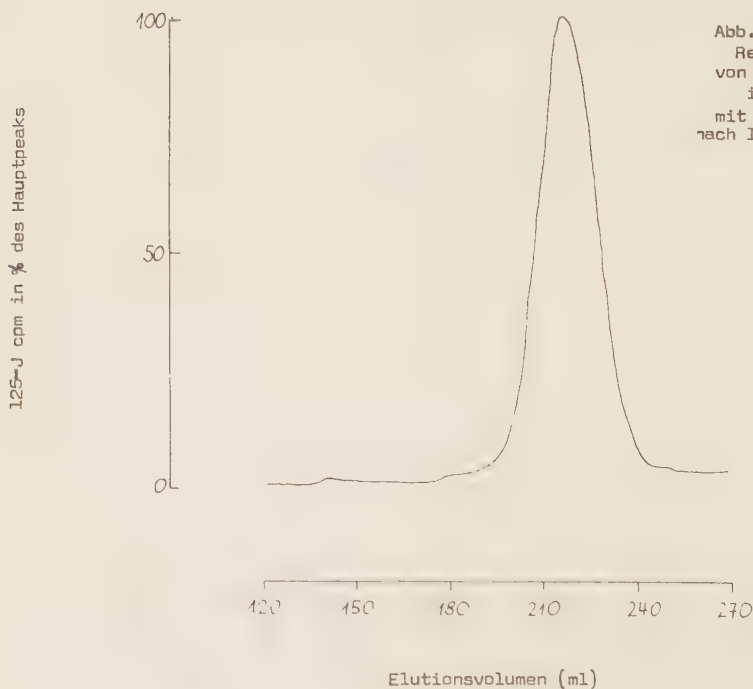
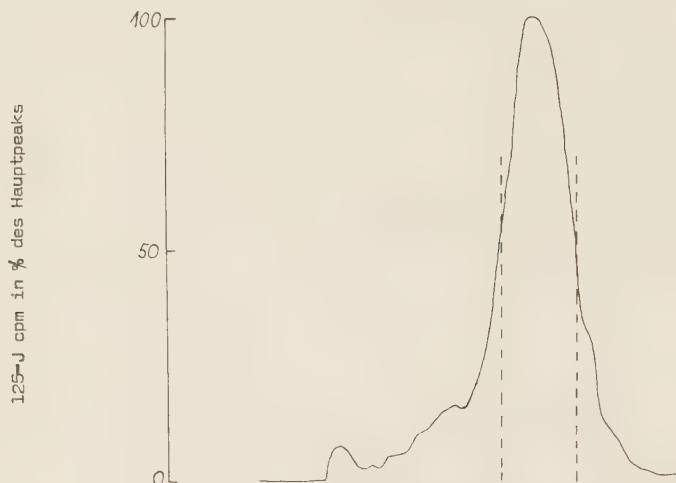
Kontrolle Plasma

- + Aprotinin
- + Heparin
- + 125-J Fibrinogen

Inkubation: 90 min bei 37 Grad C

Ergebnis: Höhe des Vorpeaks (Radioaktivität) in % des
Hauptfibrinogenpeaks: 1,78 %.

Abb.1c
 Chromatographie
 von ^{125}I -Fibrinogen
 in Tris Puffer
 mit 0,6 M NaCl-Zusatz



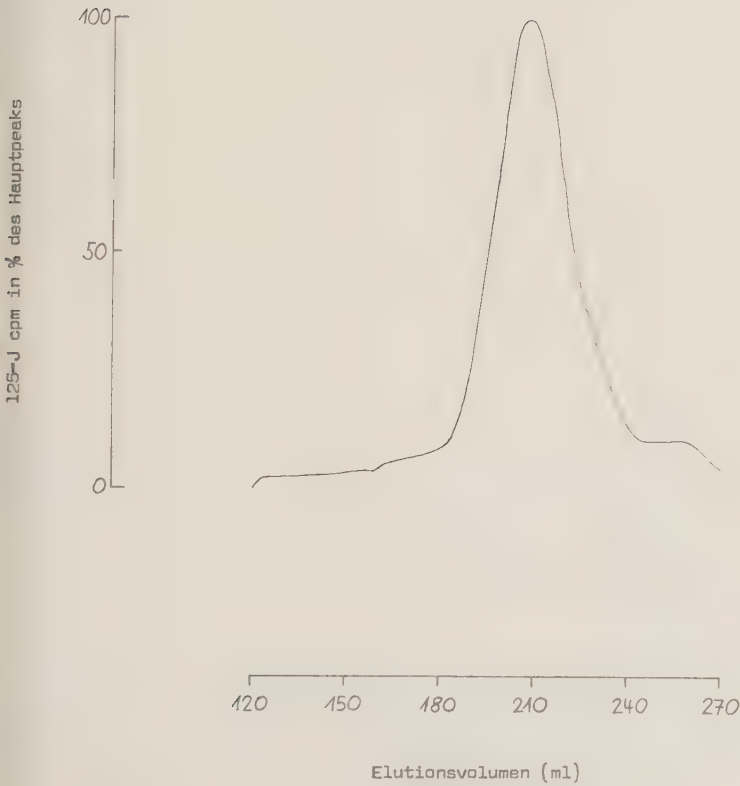
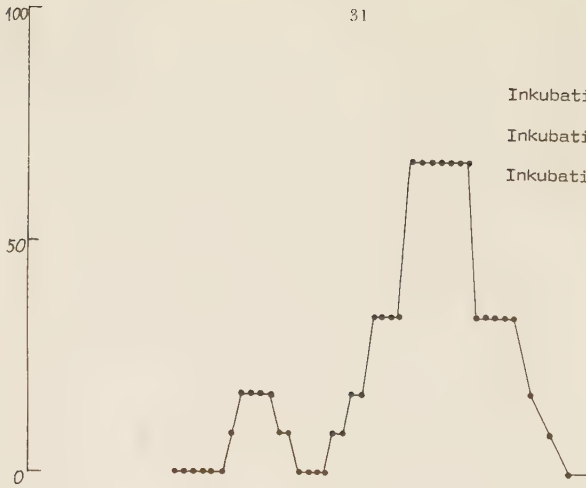


Abb.2, Versuch

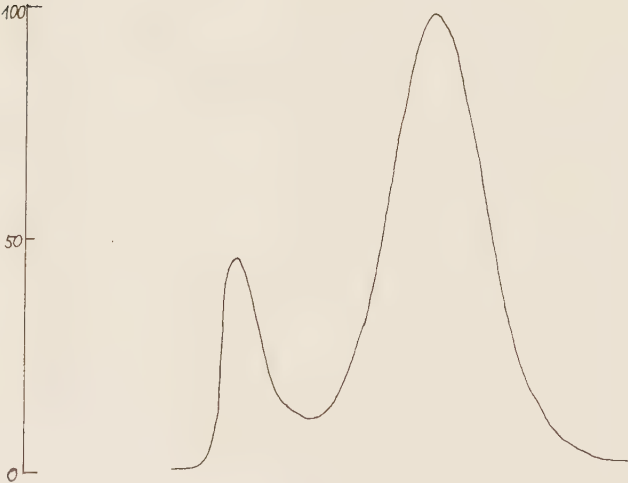
31

TRCHII ($\mu\text{g/ml}$)

Plasma
+ Aprotinin
+ ^{125}I -J Fibrinogen
+ Thrombin
Inkubation : 15 min bei 37 Grad C
+ Thrombin
Inkubation : 15 min bei 37 Grad C
+ Heparin
Inkubation : 60 min bei 37 Grad C



^{125}I cpm in % des Hauptpeaks



E 280 nm

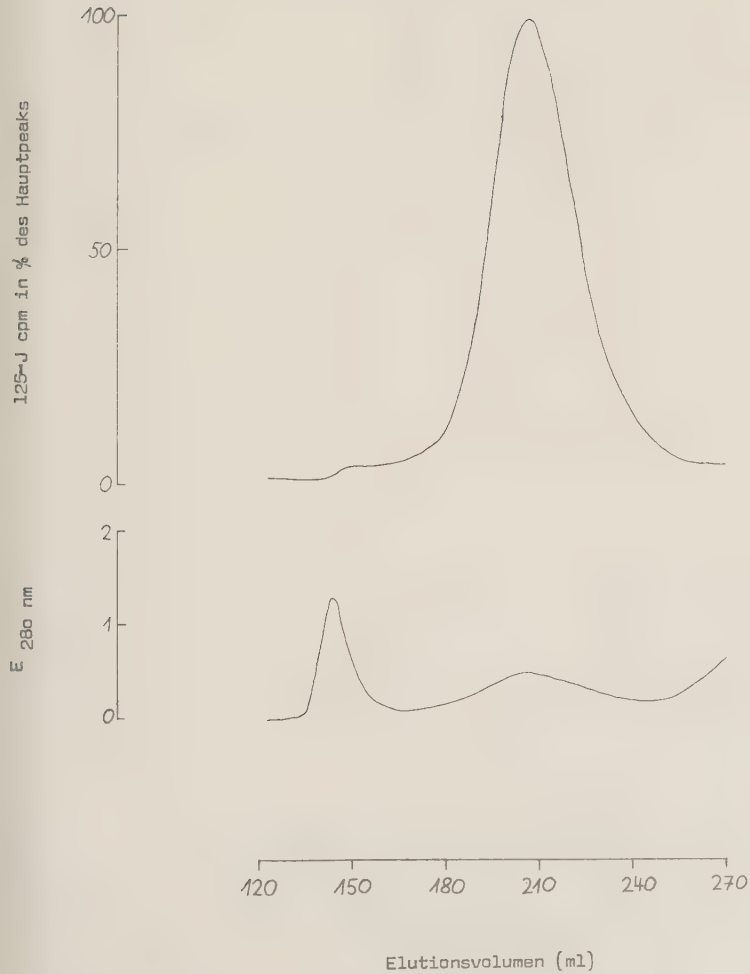


120 150 180 210 240 270

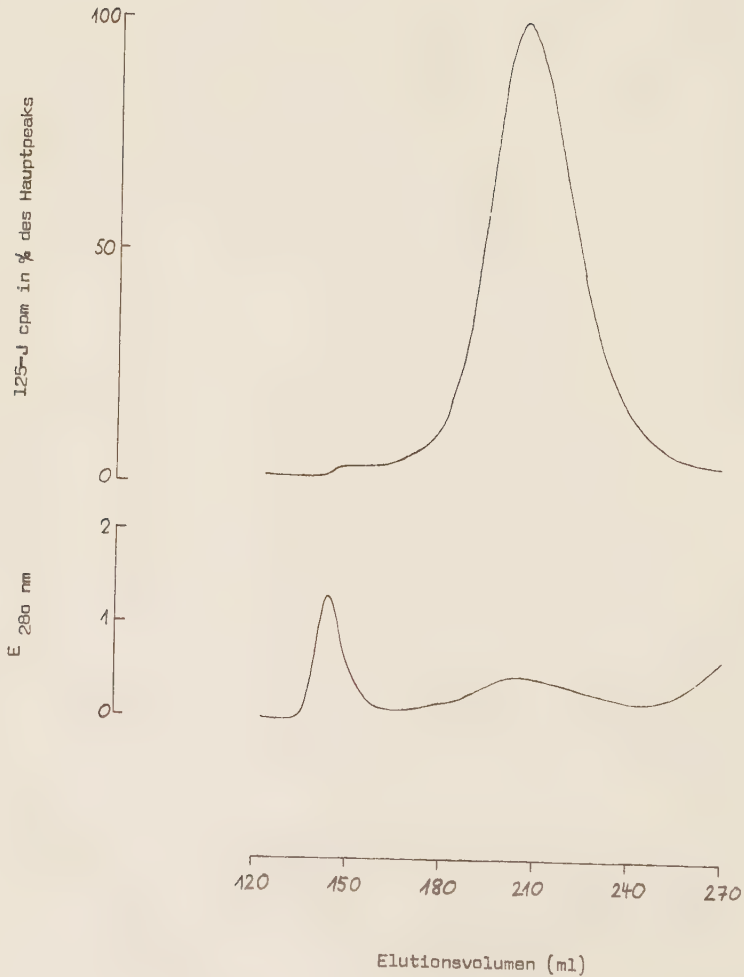
Elutionsvolumen (ml)

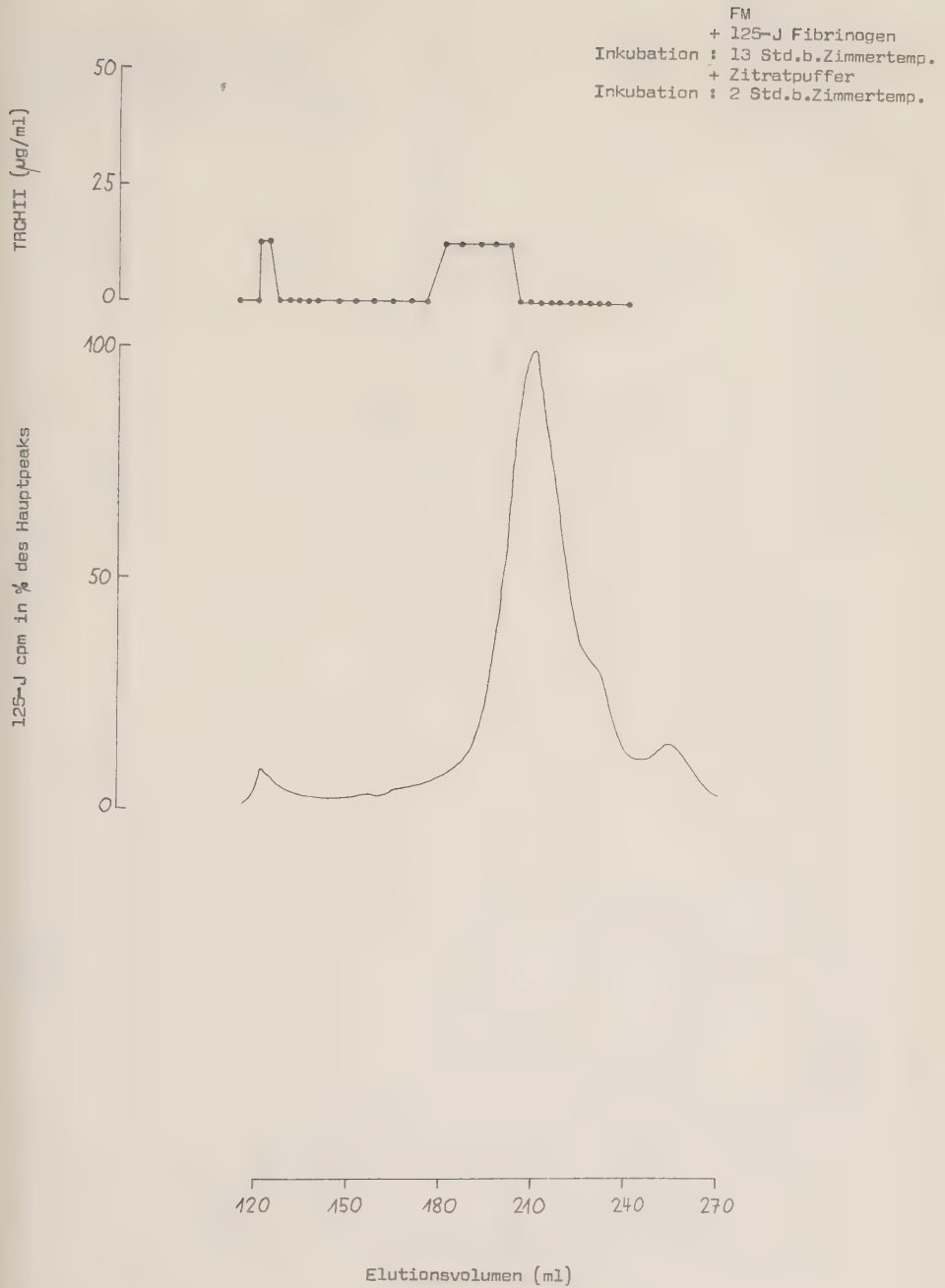
Plasma
+ Aprotinin
+ 125-J Fibrinogen

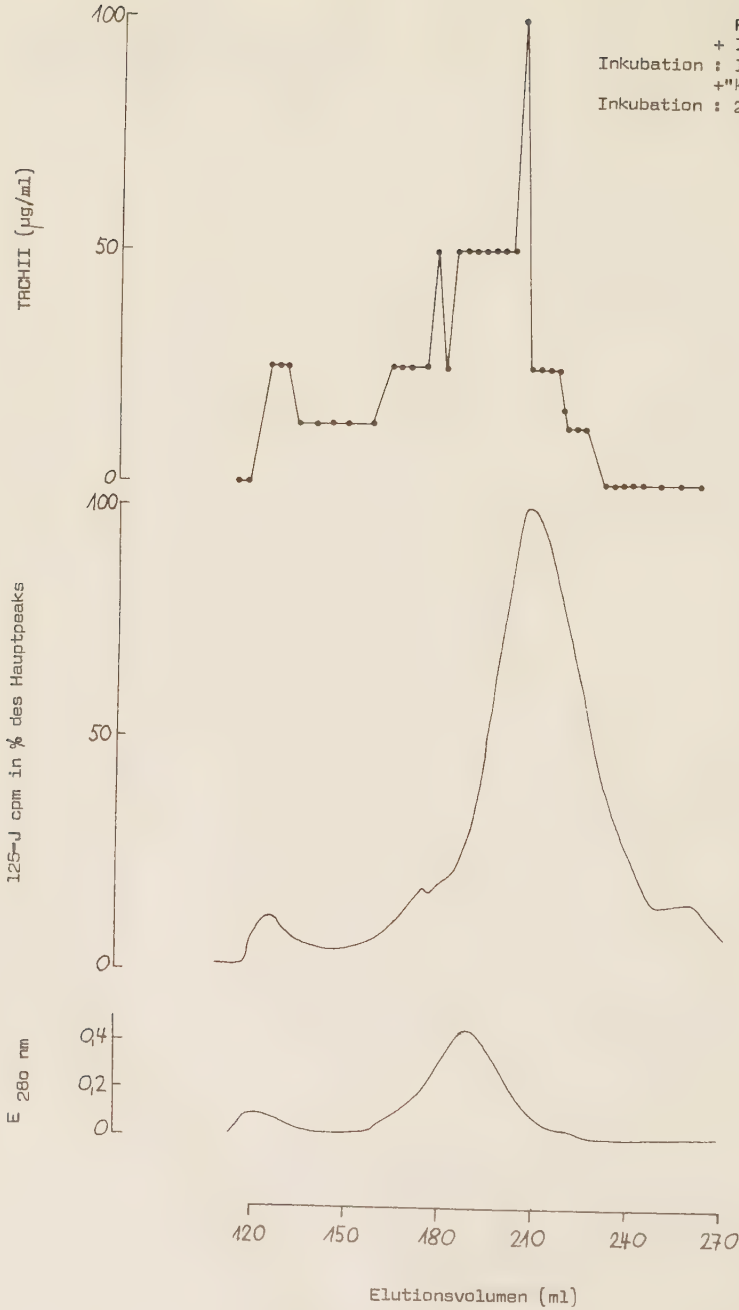
Inkubation : 90 min bei 37 Grad C



Plasma
+ Aprotinin
+ Heparin
+ ^{125}I -Fibrinogen
Inkubation: 90 min bei 37 Grad C







Fibrinogen

+ Aprotinin

+ Thrombin

Inkubation : 15 min bei 37 Grad C

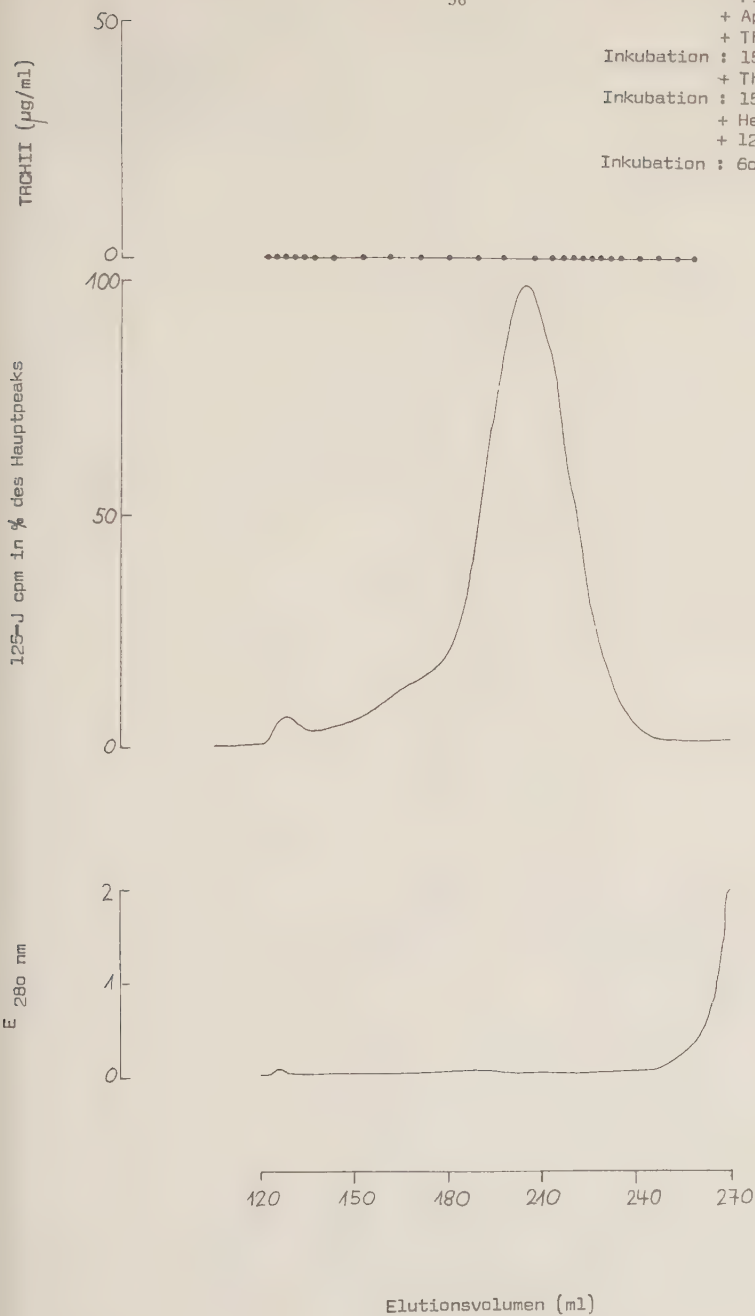
+ Thrombin

Inkubation : 15 min bei 37 Grad C

+ Heparin

+ 125 -J Fibrinogen

Inkubation : 60 min bei 37 Grad C



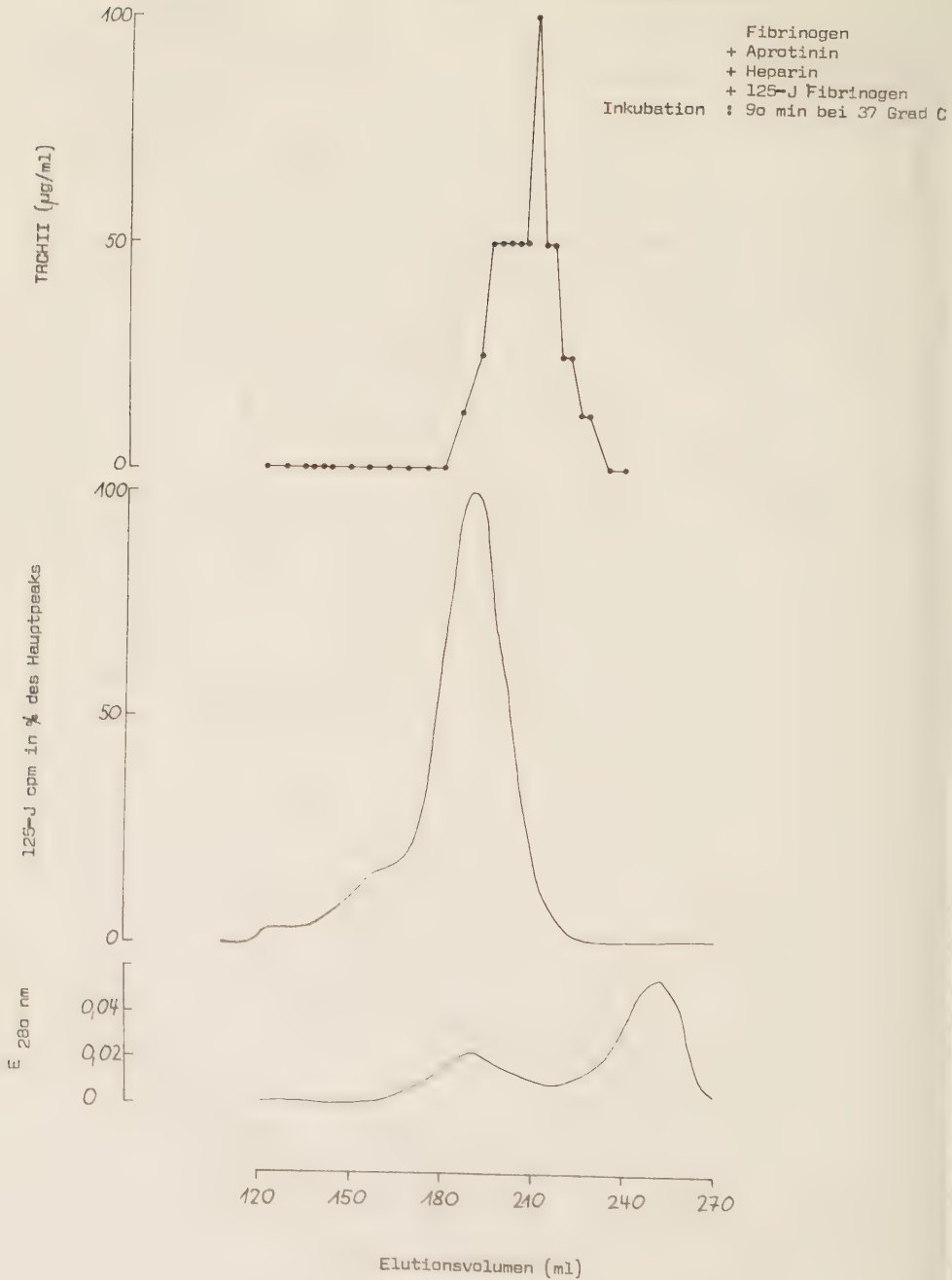


Abb.5b, Versuch

Plasma

+ Aprotinin

+ Thrombin

Inkubation : 15 min bei 37 Grad C

+ Thrombin

Inkubation : 15 min bei 37 Grad C

+ Heparin

+ 125-J Fibrinogen

Inkubation : 60 min bei 37 Grad C

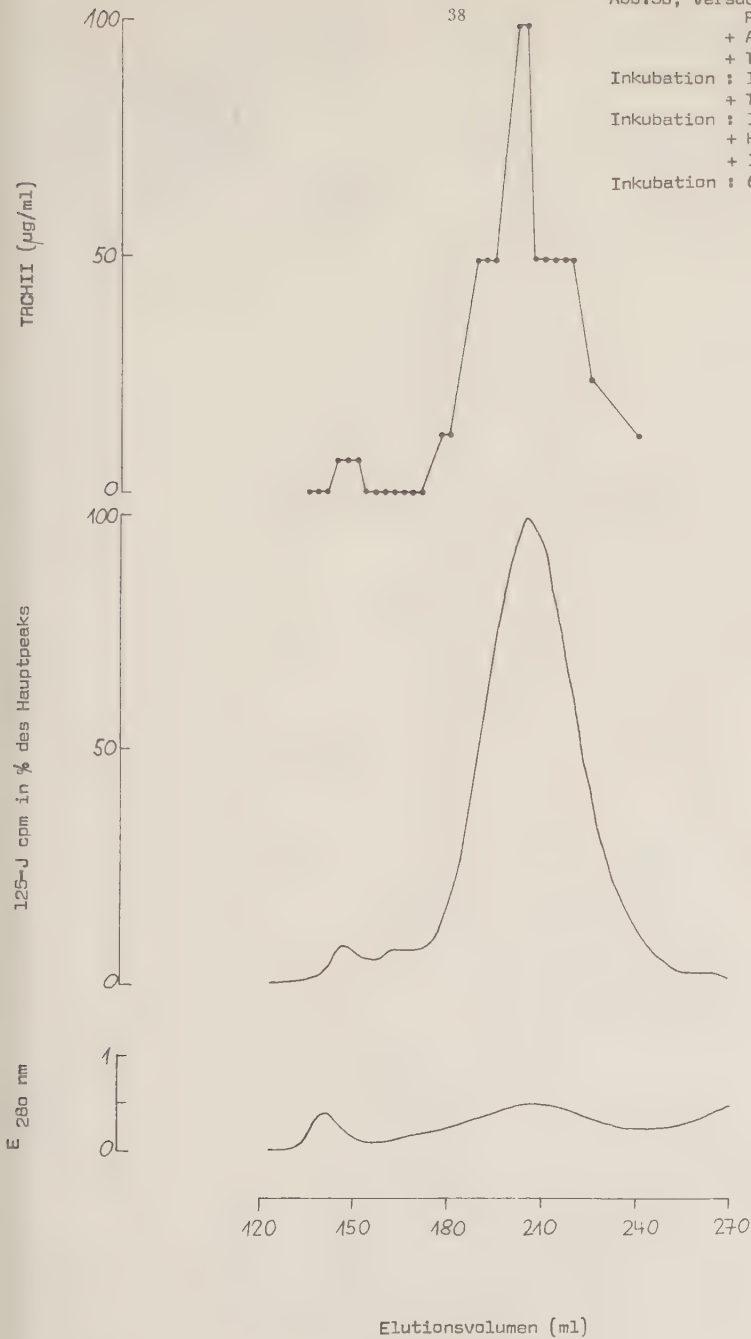


Abb.7, Kontrolle
(0,15 M NaCl-Zusatz z.Tris Puffer)

Plasma
+ Aprotinin
+ Heparin
+ 125-J Fibrinogen

Inkubation : 90 min bei 37 Grad C

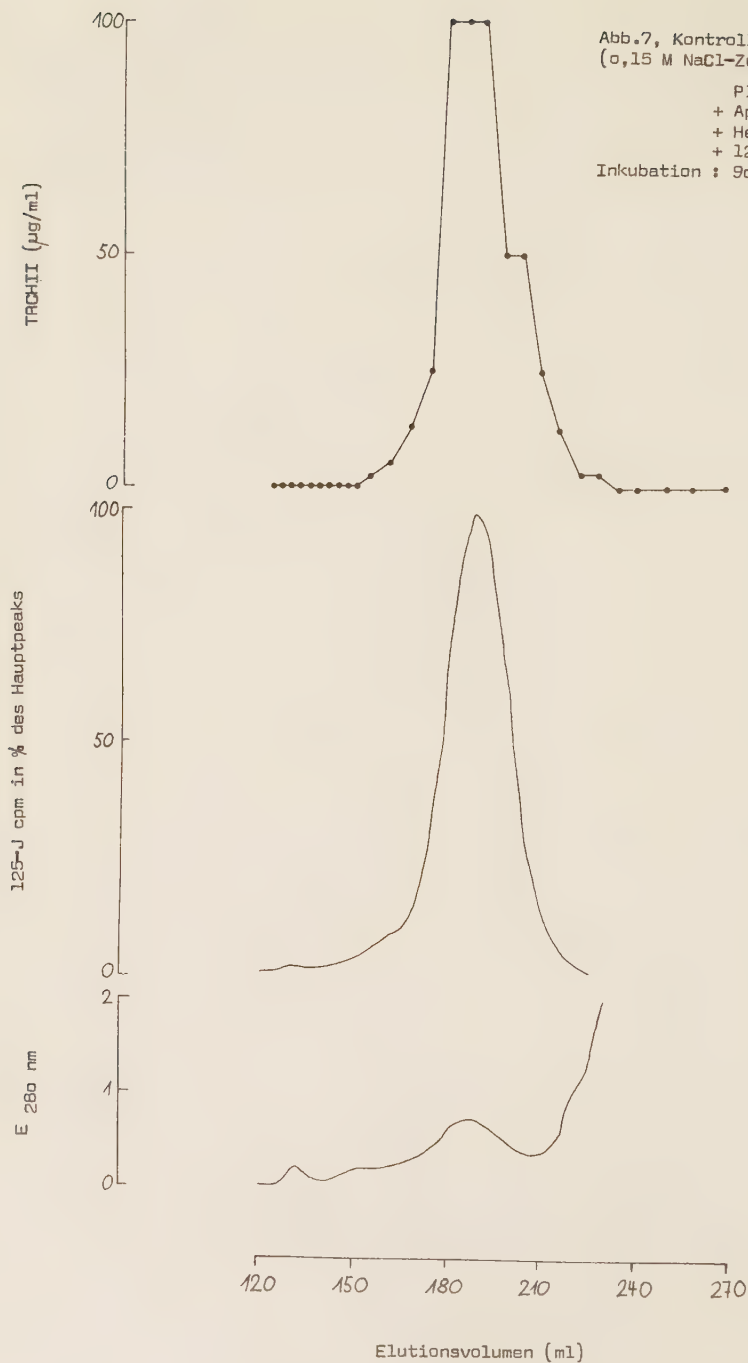


Abb.6, Versuch

Plasma

+ Monojodazetat

+ Aprotinin

+ Thrombin

Inkubation : 15 min bei 37 Grad C

+ Thrombin

Inkubation : 15 min bei 37 Grad C

+ Heparin

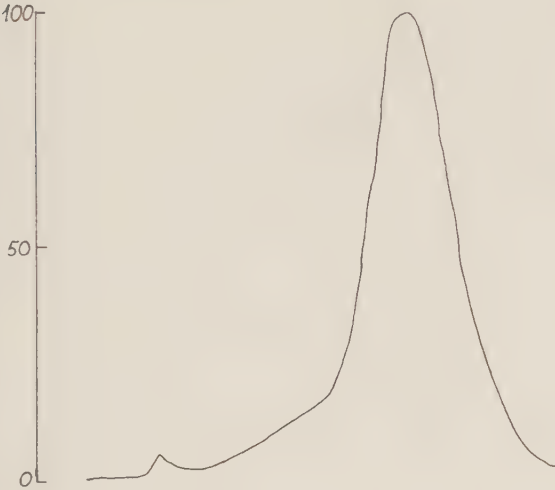
+ 125-J Fibrinogen

Inkubation : 60 min bei 37 Grad C

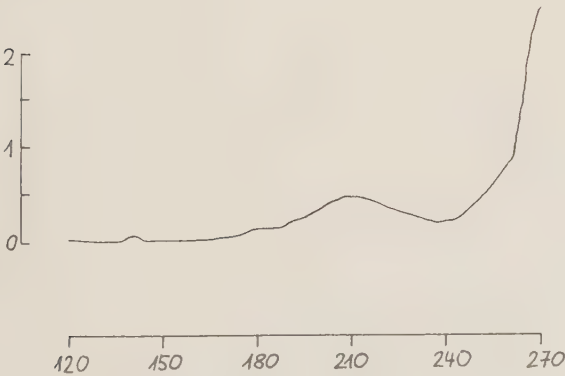
TRACHII ($\mu\text{g/ml}$)



125-J cpm in % des Hauptpeaks



E 280 nm

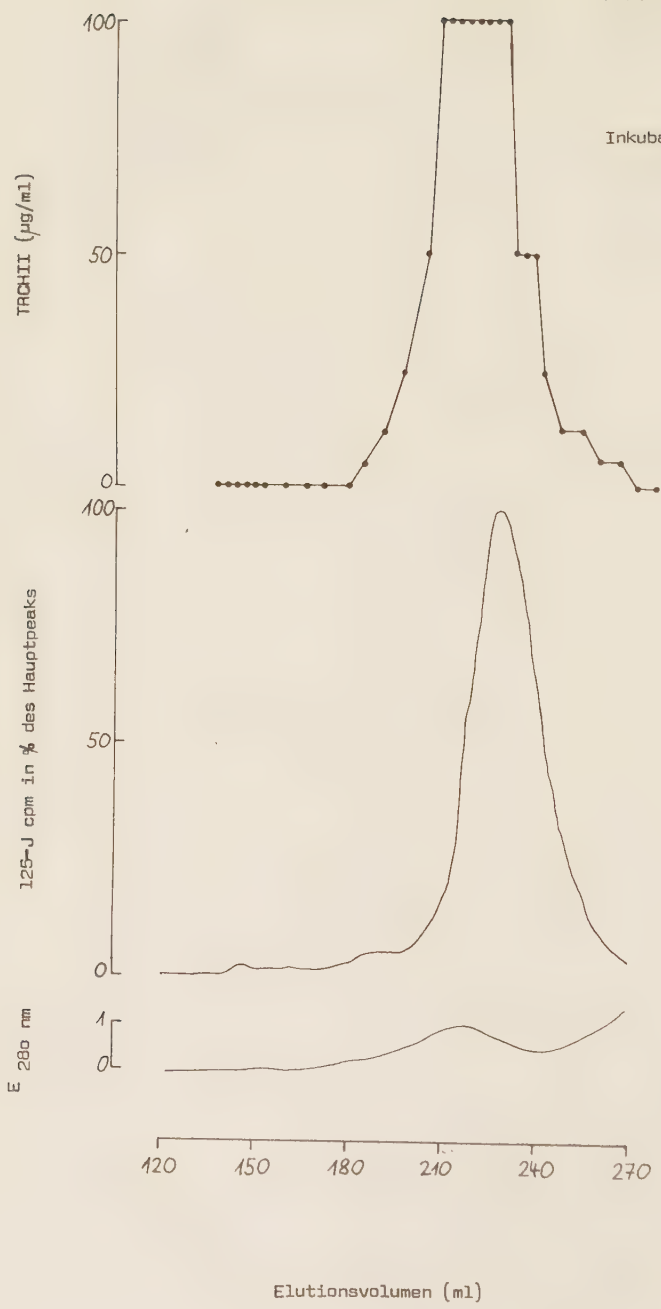


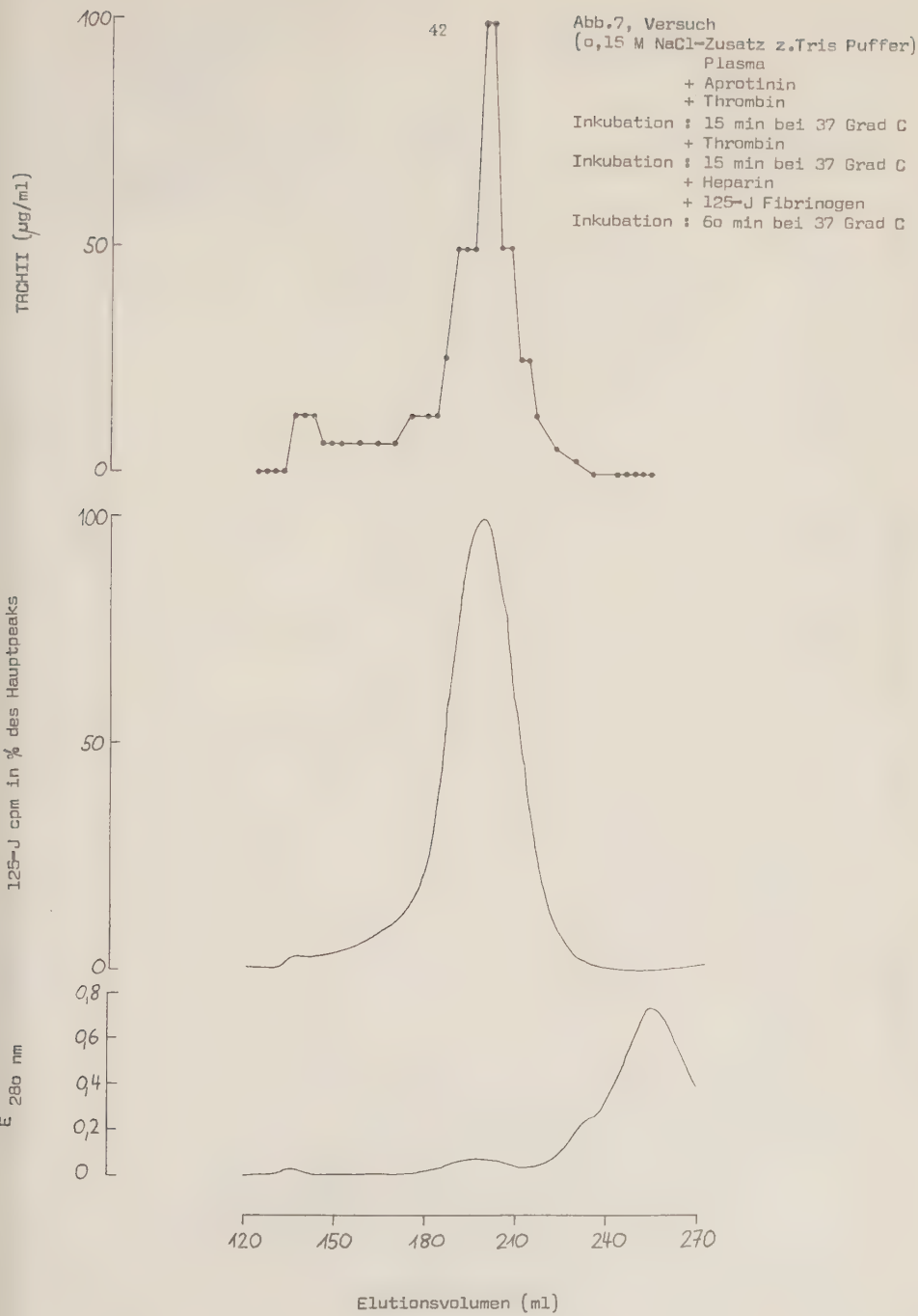
Elutionsvolumen (ml)

41

Abb.6, Kontrolle

Plasma
+ Monojodazetat
+ Aprotinin
+ Heparin
+ 125-J Fibrinogen
Inkubation: 90 min bei 37 Grad C





Plasma

+ Aprotinin

+ Thrombin

Inkubation : 15 min bei 37 Grad C

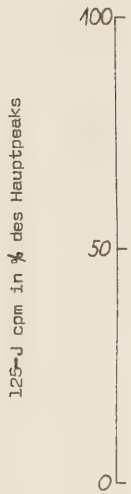
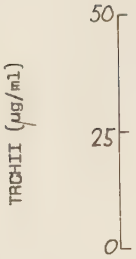
+ Thrombin

Inkubation : 15 min bei 37 Grad C

+ Heparin

+ 125 -J Fibrinogen

Inkubation : 60 min bei 37 Grad C



120 150 180 210 240 270

Elutionsvolumen (ml)

(0,4 M NaCl-Zusatz z.Tris Puffer)

Plasma

+ Aprotinin

+ Heparin

+ 125-J Fibrinogen

Inkubation: 90 min bei 37 Grad C

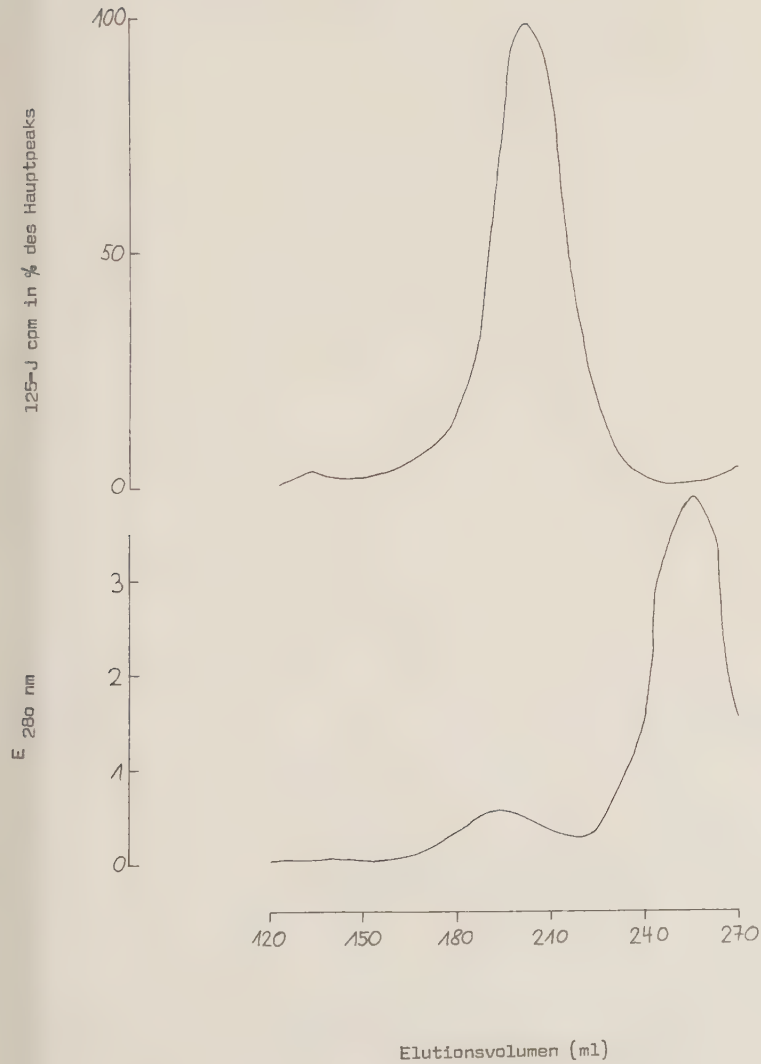


Abb.9, Versuch
(0,6 M NaCl-Zusatz z. Tris Puffer)

Plasma

+ Aprotinin

+ Thrombin

Inkubation : 15 min bei 37 Grad C

+ Thrombin

Inkubation : 15 min bei 37 Grad C

+ Heparin

+ 125 J Fibrinogen

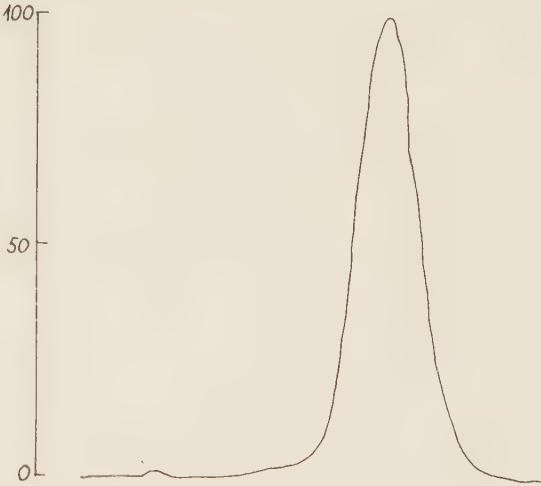
Inkubation : 60 min bei 37 Grad C

45

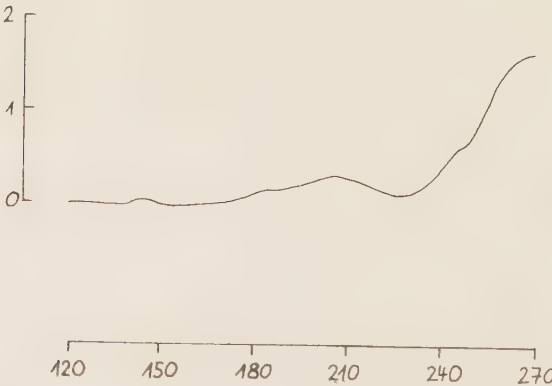
TRCHII (μ g/ml)



125 J cpm in % des Hauptpeaks



E 280 nm

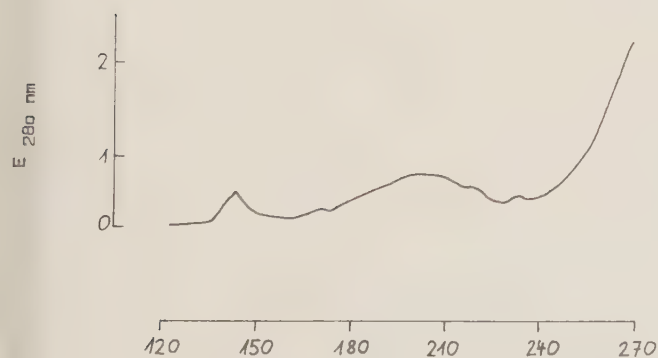
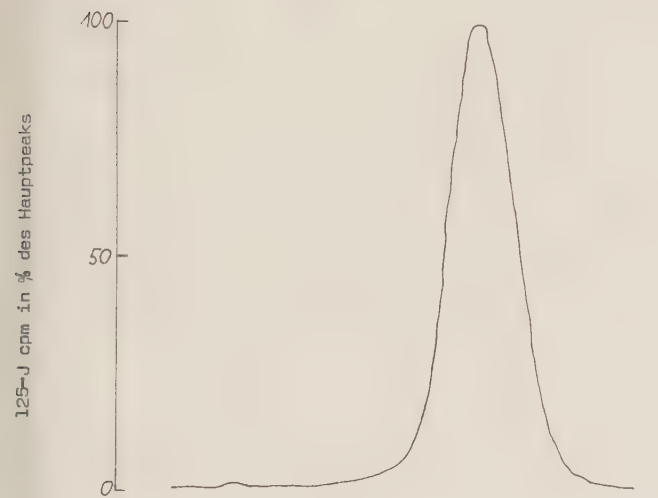


Elutionsvolumen (ml)



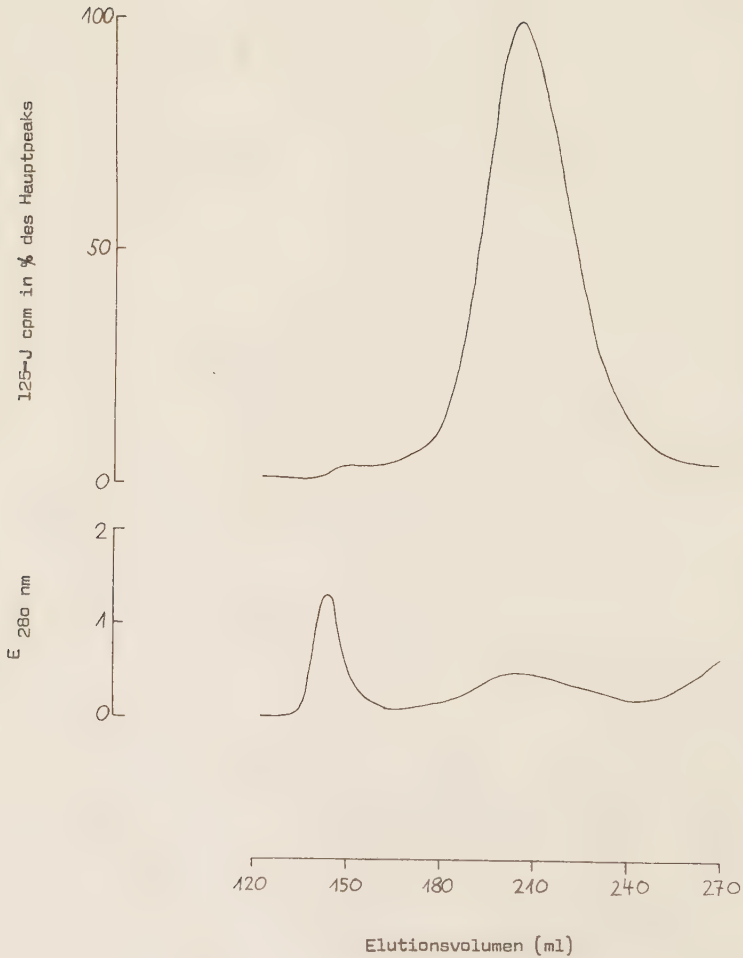
Abb.9, Kontrolle
(0,6 M NaCl-Zusatz z. Tris Puffer)

Plasma
+ Aprotinin
+ Heparin
+ $^{125}\text{-J}$ Fibrinogen
Inkubation : 90 min bei 37 Grad C



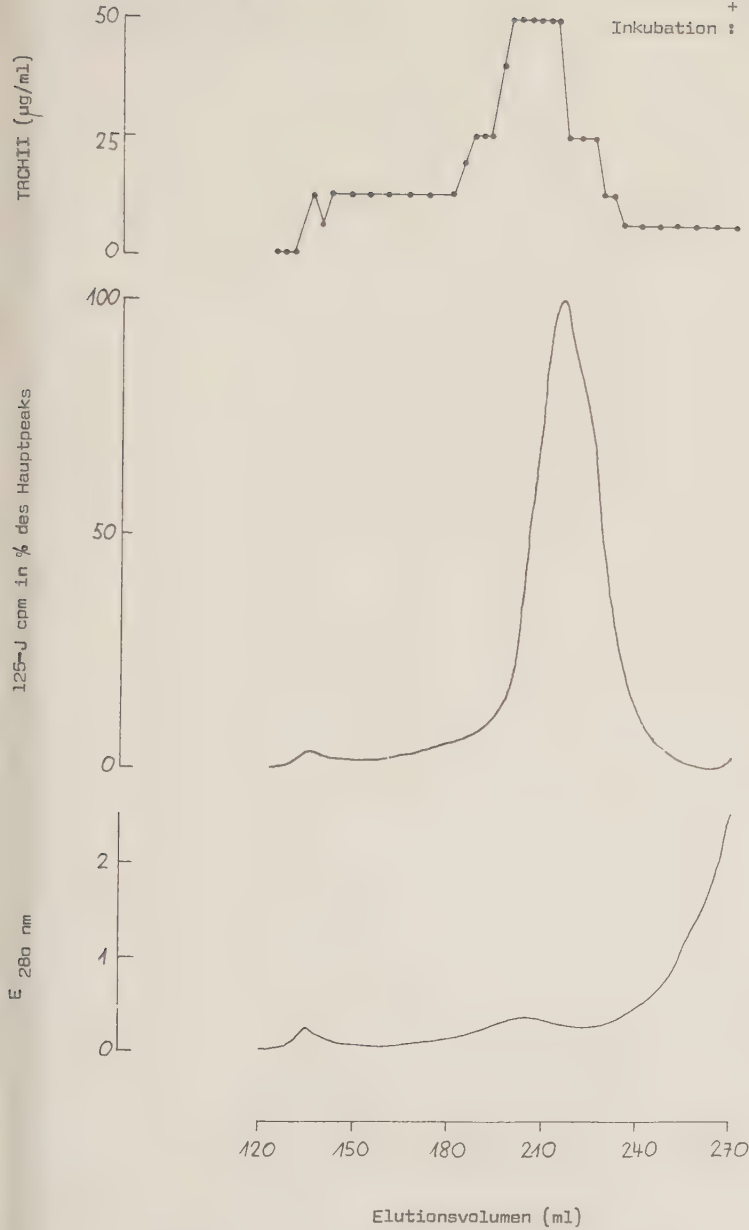
Elutionsvolumen (ml)

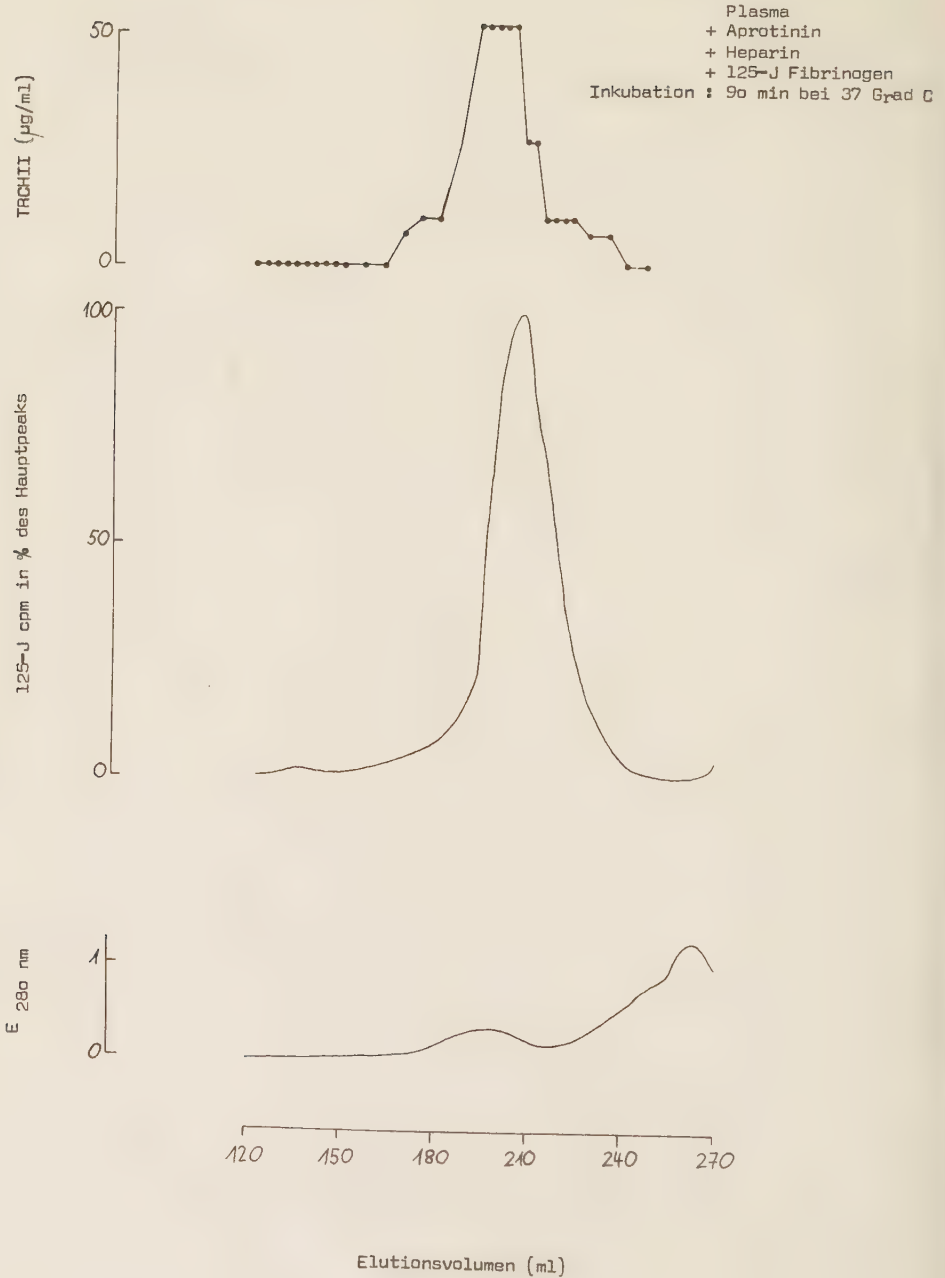
Plasma
+ Aprotinin
+ Heparin
+ ^{125}I -Fibrinogen
Inkubation : 90 min bei 37 Grad C

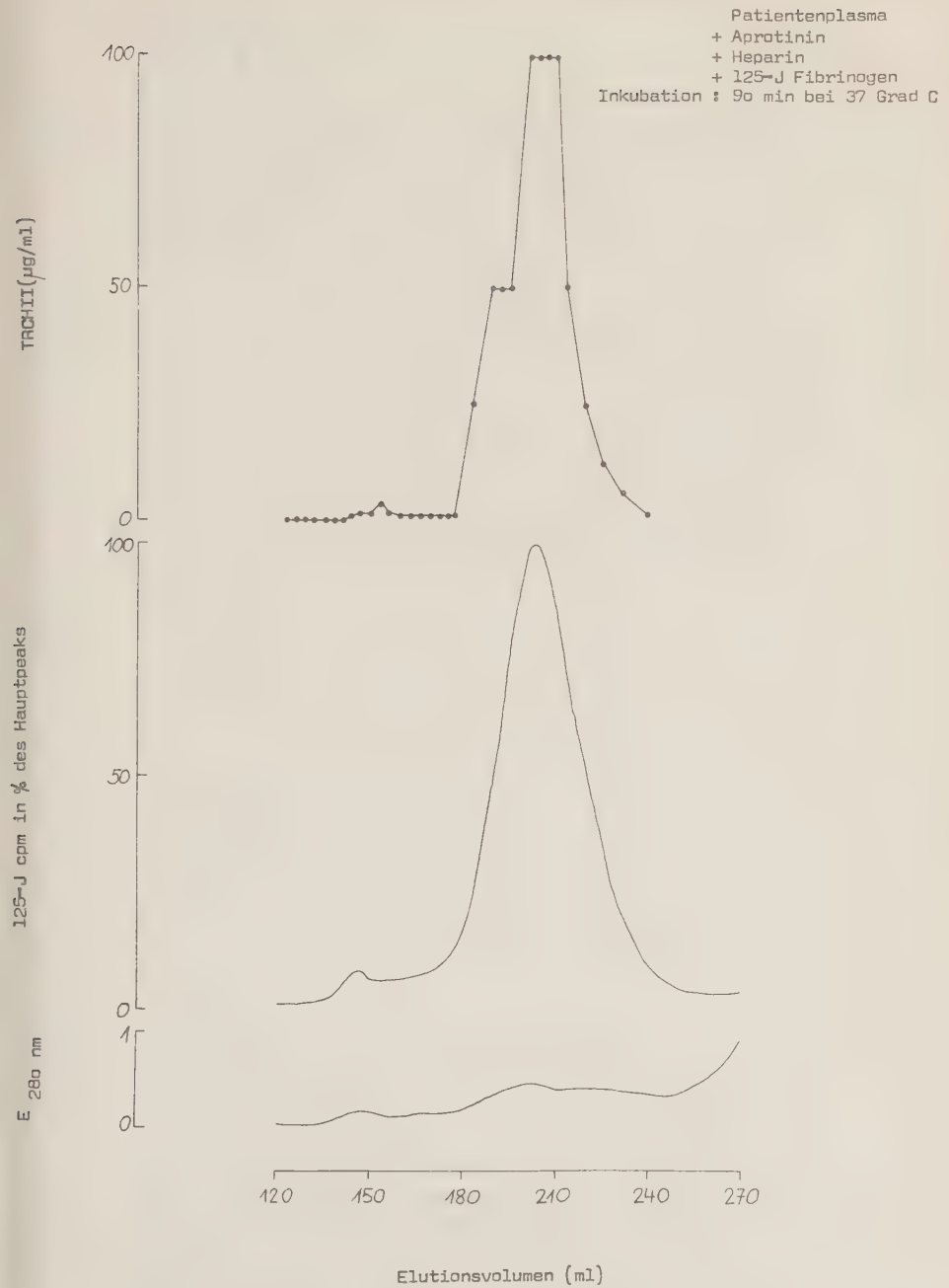


Patientenplasma
 + Aprotinin
 + Heparin
 + ^{125}I -Fibrinogen

Inkubation : 90 min bei 37 Grad C







VI. Diskussion

Der direkte Nachweis von isolierten Fibrinmonomeren (FM) im Blut von Patienten mit intravasaler Gerinnung scheitert an der spontanen Polymerisationstendenz der Fibrinmonomere. Mittels Gelchromatographie jedoch lässt sich aus dem Plasma dieser Patienten ein Proteinmaterial mit höherem Molekulargewicht als Fibrinogen abtrennen, dessen Herkunft aus Fibrinogen immunologisch durch Reaktion mit Antifibrinogenserum als gesichert geltendarf (13). Dieses hochmolekulare, aus Fibrinogen stammende Material wird ganz allgemein als "lösliche Fibrinkomplexe (SFC)" bezeichnet. Auf Grund von in vitro-, zum Teil auch von in vivo-Untersuchungen zahlreicher Autoren wurde im Prinzip folgende Konstellation in der Zusammensetzung von SFC gefunden (2):

1. Reaktion von FM untereinander unter Bildung von löslichen Fibrinoligomeren.
2. Kopolymerisation von FM mit Fibrinogen.
3. Kopolymerisation von FM mit (fibrinolytischen) Fibrinogenspaltprodukten.
4. Kopolymerisation von FM mit (fibrinolytischen) Fibrinspaltprodukten.
5. Komplexbildung von Fibrinspaltprodukt X.
6. Komplexbildung von Fibrinogen und Fibrinspaltprodukt X.
7. SFC-Bildung durch chemische Quervernetzung von Fibrinogenmolekülen unter Faktor XIII-Einwirkung.

Es sind also nicht in allen SFC Fibrinmonomere als komplexbildende Komponente enthalten. Aus diesem Grunde werden fibrinmonomerhaltige SFC besser als lösliche Fibrinmonomerkomplexe (SFMC) bezeichnet. Nur der Nachweis von SFMC und von durch Faktor XIII quervernetztem Fibrinogen (Faktor XIII wird durch Thrombin aktiviert) könnte einen direkten Hinweis auf einen

noch aktiven intravasalen Gerinnungsprozeß liefern.

Mit den bisher üblichen Nachweismethoden lassen sich jedoch SFMC von den übrigen SFC nicht scharf unterscheiden.

Von klinisch praktischem Interesse wäre der spezifische Nachweis von SFMC vor allem bei klinisch symptomarmen intravasalen Gerinnungsprozessen, besonders wenn Thrombozytenzahl, Fibrinogenkonzentration, sowie die Bestimmung einzelner Gerinnungsfaktoren, die Thrombinzeit und andere bisher üblicherweise gebrauchte Testsysteme keinen eindeutigen Hinweis auf eine intravaskuläre Aktivierung der Blutgerinnung ermöglichen. Vor allem handelt es sich hier um Patienten mit chronischer Verbrauchskoagulopathie im Rahmen maligner Erkrankungen, postoperative, bettlägerige Patienten mit klinisch noch nicht apparenter tiefer Venenthrombose oder aber thrombosegefährdete Patienten im Zustand einer Hyperkoagulabilität.

Zur Zeit erfüllt die von Fletcher und Alkjaersig (13) angegebene Nachweismethode von SFMC am ehesten die Kriterien eines spezifischen Testsystems. Das Prinzip dieser Methode ist folgendes:

Die Plasmaprobe wird bei Raumtemperatur über kurze (30 cm lange) Biogel A-5m Säulen chromatographiert. Als Elutionsmedium verwenden die Autoren einen 0,06 molaren Tris Puffer (pH 7,6) mit einem Zusatz von 0,3 Mol/Liter NaCl. Das Eluat wird in Fraktionen gleichen Volumens gesammelt, und Fibrinogenmaterial in den einzelnen Fraktionen immunologisch quantitativ bestimmt. Fibrinogen erscheint in den Fraktionen als symmetrischer Proteingipfel mit genau definiertem Elutionsvolumen. Höhermolekulares Fibrinogenmaterial (SFC) befindet sich in den vor dem Fibrinogengipfel

eluierten Fraktionen; Fibrinogenmaterial mit einem geringeren Molekulargewicht als Fibrinogen erscheint in den Fraktionen nach dem Fibrinogengipfel, (Fibrin- bzw. Fibrinogenspaltprodukte). Mittels einer von Alkjaersig et al. (1) entwickelten Computeranalyse kann eine semiquantitative Bestimmung der den Elutionskurven des Fibrinogenmaterials zugrundeliegenden höher- und niedrigermolekularen Fibrinogenderivate erreicht werden.

Unter Verwendung dieses Testsystems fanden diese Autoren eine gute Korrelation zwischen dem Auftreten von SFMC und subklinischen tiefen Venenthrombosen bei postoperativen Patienten (2), thromboembolischen Ereignissen bei oraler kontrazeptiver Therapie (1), akuten zerebrovaskulären thrombotischen Ereignissen (8), akutem Myokardinfarkt (14) und Patienten mit akuter Sichelzellerkrankung (10).

Zu ähnlichen Ergebnissen mit dem gelchromatographischen Nachweis von SFC bei intravaskulären Gerinnungsprozessen im Rahmen zum Teil anderer Krankheitsbilder kamen auch andere Autoren (2,9,20,21,26).

Diese sehr sensible Testmethode eignet sich gut zur sicheren Diagnose und zum Studium subklinischer intravasaler Gerinnung, wo bisher übliche gerinnungsphysiologische Testsysteme häufig versagen, und ermöglicht damit über eine verfeinerte Diagnostik neue prognostische und therapeutische Erkenntnisse. Der große Nachteil dieser Methode liegt in ihrer zeitlichen Aufwendigkeit, wobei die immunologische Bestimmung der Fibrinogenderivate die meiste Zeit in Anspruch nimmt. Daher ist diese Methode für dringende klinische Fragestellungen von geringerem Wert als schnell durchführbare, aber weniger sensible und weniger spezifische Nachweismethoden von SFMC, wie der Äthanoltest nach Godal (16).

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war daher, über eine in vitro-Markierung präexistenter SFMC in Patientenplasma mit ¹²⁵-J Fibrinogen eine rasche,

qualitative oder semiquantitative Nachweismöglichkeit von SFMC nach Gelchromatographie zu erhalten, ohne die Ergebnisse einer nachfolgenden, genaueren immunologischen Bestimmung von SFMC in den eluierten Fraktionen zu verfälschen.

125-J Fibrinogen muß, wenn es zur Markierung von SFMC verwendet werden soll, vor allem eine Voraussetzung erfüllen: Es muß sich bei der Gelchromatographie wie natives Fibrinogen verhalten, das heißt, in einem symmetrischen Proteingipfel eluierbar sein. Dieser sollte dieselbe Position wie natives Fibrinogen haben und keine Vorgipfel als Ausdruck höhermolekularen Fibrinogenmaterials aufweisen. Diese Voraussetzung trifft auf das verwendete kommerzielle 125-J Fibrinogenpräparat nicht zu. Dieses markierte Fibrinogen weist sowohl bei Chromatographie in Tris Puffer mit 0,3 M NaCl Zusatz wie auch bei höherer Ionenstärke höhermolekulares Fibrinogenmaterial auf (Abb.1a,1c).

Zusätzlich ist dieses Fibrinogenpräparat auch nach gelchromatographischer Abtrennung der hochmolekularen Aggregate in Puffer mit 0,3 M NaCl nicht stabil (Abb.1b). Wenn man jedoch die Abtrennung dieser Fibrinogenaggregate bei 0,6 Mol NaCl-Zusatz durchführt, und das so nachgereinigte Fibrinogen in demselben Puffer bei 4 Grad C lagert, kommt es auch nach mehrwöchiger Lagerung nur zu einer minimalen Bildung hochmolekularen Fibrinogenmaterials (Abb.1d).

Da Vermylen und Mitarbeiter (61) zeigen konnten, daß tiefgefrorenes Fibrinogen nach dem Auftauen bis zu vier Vorgipfel im Gelchromatogramm aufweisen kann, wurde eine tiefere Lagerungstemperatur als 4 Grad C vermieden.

Dieses so vorgereinigte und stabilisierte Fibrinogen eignet sich in gleicher Weise wie natives Fibrinogen zur in vitro-Herstellung von SFMC nach der Methode von Müller-Berghaus (45). Wird Normalplasma wiederholt mit geringen Thrombinmengen versetzt, und

anschließend die Thrombinwirkung mit Heparin unterbrochen, so findet man nach Chromatographie über Biogel A-5m mittels immunologischer Methoden ein charakteristisches Verteilungsmuster des Fibrinogenmaterials im Gelchromatogramm: mit und unmittelbar hinter dem Ausschlußvolumen erscheinen in Form eines relativ symmetrischen Gipfels hochmolekulare SFMC, die an typischer Stelle von dem symmetrischen Fibrinogengipfel gefolgt werden.

Setzt man diesem Plasma vor Thrombinzusatz Spuren von 125-J Fibrinogen zu, so zeigt sich nach Ausmessung der radioaktiven Fraktionen im Bohrlochkristall eine Aktivitätsverteilung im Chromatogramm, die genau dem immunologisch bestimmten Fibrinogenmaterial entspricht (Abb.2). Auch das Mengenverhältnis von markierten SFMC zu markiertem unveränderten Fibrinogen entspricht den immunologisch ermittelten Werten.

Wenn in saurem Milieu dissoziierte und in Lösung gehaltene Fibrinmonomere mit einer Fibrinogenlösung zusammengebracht werden, und gleichzeitig der pH-Wert gegen den neutralen Bereich hin angehoben wird, findet man nach Entfernung des durch spontane Polymerisation der Fibrinmonomere entstandenen Gerinnsels und folgender Gelchromatographie mit Biogel A-5m ein chromatographisches Elutionsmuster des Fibrinogenmaterials, welches dem eben beschriebenen nahezu gleicht. Setzt man in dieser Versuchsanordnung der Fibrinogenlösung 125-J markiertes Fibrinogen zu, so findet man nach Messung der Radioaktivität in den eluierten Fraktionen in gleicher Weise einen hochmolekularen Vorgipfel im Bereich des Ausschlußvolumens, sowie einen Radioaktivitätsgipfel im Bereich des nativen Fibrinogens (Abb.3). Es kann kein Zweifel bestehen, daß es sich bei dem hochmolekularen Fibrinogenmaterial im Ausschlußvolumen um SFMC, oder präziser ausgedrückt, um Polymerisationsprodukte von Fibrinmono- bzw. Fibrinoligomeren und Fibrinogen handelt. Sie müssen in ihrer Zusammensetzung im wesentlichen jenen SFMC entsprechen, die

nach Zusatz kleiner Thrombinmengen zu Normalplasma nachzuweisen sind.

Erzeugt man nach der Methode von Müller-Berghaus in gereinigtem Fibrinogen (Abb.5a) oder in Normalplasma (Abb.5b) SFMC, und inkubiert nach Unterbrechung der Thrombinwirkung durch Heparin anschließend mit $^{125}\text{-J}$ Fibrinogen, so läßt sich nach Gelchromatographie im Ausschlußvolumen ein deutlicher Radioaktivitätsgipfel nachweisen. Dieser entspricht in seiner Lokalisation dem immunologisch bestimmbaren hochmolekularen SFMC-Gipfel. Es ist also durch Inkubation von SFMC mit $^{125}\text{-J}$ Fibrinogen zu einer Markierung der SFMC gekommen.

Für das Zustandekommen markierter Fibrinmonomerkomplexe kommen prinzipiell folgende Möglichkeiten in Frage:

1. Die Thrombinaktivität wurde durch Heparin nicht ausreichend unterbrochen. Dagegen spricht, daß sowohl die Fibrinogenlösung als auch das Plasma nach Neutralisation der Thrombinwirkung durch Heparin auch durch größere Thrombinmengen nicht mehr zur Gerinnung gebracht werden konnte, obwohl noch genügend residuales Fibrinogen vorhanden war.
2. Die Markierung der SFMC erfolgte durch Austausch des in SFMC gebundenen Fibrinogens mit freiem Fibrinogen. Um über diese Möglichkeit und das Ausmaß einer eventuellen Austauschbarkeit des Fibrinogens Aufschlüsse zu erhalten, wurde eine nach der oben beschriebenen Methode aus Fibrinmonomeren und markiertem Fibrinogen hergestellte SFMC-Lösung nachträglich mit nicht markiertem Fibrinogen 13 Stunden lang inkubiert. Gleichzeitig wurde ein Aliquot dieser SFMC-Lösung mit Puffer inkubiert. Ein Vergleich der Radioaktivitätsgipfel im Ausschlußvolumen nach Gelchromatographie bei der Lösungen zeigt, daß sie sich in ihrer Höhe nicht erheblich unterscheiden. Im Falle eines wesentlichen Austausches

des komplexgebundenen Fibrinogens hätte eine deutliche Verkleinerung des Radioaktivitätsgipfels nach Inkubation der markierten SFMC mit nicht markiertem Fibrinogen erfolgen müssen (vgl. Abb. 3, Abb. 4).

Auf Grund dieses Untersuchungsergebnisses erscheint eine Markierungsmöglichkeit präexistenter SFMC mit 125-J Fibrinogen durch Austausch mit dem komplexgebundenem Fibrinogen, wie von Jakobsen und Mitarbeitern (28) angenommen wird, eher unwahrscheinlich, sofern im Plasmamillieu nicht andere Bedingungen für einen derartigen Austausch vorliegen. Gegen diese Markierungsmöglichkeit spricht auch, daß bei den Versuchen 7, 8, 9 immunologisch zwar große Mengen an SFMC, aber trotz langer Inkubationszeit mit 125-J Fibrinogen nur geringe Mengen radioaktiv markierter SFMC nachgewiesen werden konnten. Diese Diskrepanz könnte theoretisch mit einer geringfügigen Faktor XIII-Aktivität und damit verbundener irreversibler chemischer Quervernetzung von SFMC in den Zitratplasmen erklärt werden.

Daß eine Fibrinverfestigung durch Faktor XIII in den verwendeten Versuchsanordnungen jedoch keinen großen Einfluß auf eine eventuelle Austauschbarkeit haben dürfte, läßt sich aus folgendem schließen: wenn man einem Zitratplasma vor der Herstellung von SFMC nach Müller-Berghaus Monojodazetat, einen potenten Inhibitor der Faktor XIII-Aktivität (57) zugesetzt und anschließend das Plasma mit 125-J Fibrinogen inkubiert, läßt sich kein vermehrter Einbau von markiertem Fibrinogen in die SFMC beobachten (Abb. 6).

3. Die Markierung der SFMC erfolgte während der Kopolymerisation von Fibrinmono- bzw. Fibrinoligomeren mit Fibrinogen in einem zeitabhängigen Prozeß.

Wenn nicht zu lange Zeit zwischen der Fibrinmonomerenentstehung und der Inkubation mit markiertem Fibrinogen verstreicht, könnten noch freie Bindungsstellen der SFMC zur Zusammenlagerung mit Fibrinogen zur Verfügung stehen. Diese Annahme müßte in weiteren Versuchsreihen, die über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen, erhärtet werden.

Die unter 1., 2., 3. aufgeführten Möglichkeiten der Anlagerung von 125-J Fibrinogen an bereits bestehende SFMC schließen weitere, bisher nicht untersuchte Formen der Anlagerung nicht aus.

Mit 125-J Fibrinogen lassen sich nicht nur in vitro erzeugte SFMC markieren. Auch im Plasma von Patienten mit gesicherter Verbrauchskoagulopathie mit positivem Äthanolttest können SFMC durch nachträgliche Inkubation der Plasmen mit 125-J Fibrinogen nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Patienten mit Verbrauchskoagulopathie untersucht. Bei Patientin "A" bestand als Grundkrankheit ein metastasierendes Ovarialkarzinom, bei Patient "B" eine akute Promyelozytenleukämie. Im Plasma beider fanden sich nach Gelchromatographie im Vergleich zu normalen Kontrollplasmen deutliche Radioaktivitätsgipfel in den Ausschlußvolumina (Abb.10, Versuch und Kontrolle; Abb.11, Versuch und Kontrolle). Dementsprechend ließen sich bei beiden Patienten SFMC in den betreffenden Fraktionen immunologisch nachweisen.

Es lassen sich also sowohl in vitro erzeugte SFMC als auch im Rahmen von Verbrauchskoagulopathien aufgetretene SFMC durch Inkubation mit 125-J Fibrinogen auf sehr einfache Weise markieren; nach gelchromatographischer Abtrennung über Biogel A-5m können sie durch Ausmessung der Radioaktivität im Szintillationszähler einfach und rasch nachgewiesen werden. Dieser Nachweis ist aber nicht streng quantitativ. Um eine quantitative Aussage zu erhalten, muß nach wie vor die zeitlich aufwendige immunologische Bestimmung des Fibrinogenmaterials in den einzelnen Fraktionen durchgeführt werden. Das Ergebnis

immunologischer Bestimmung von SFMC in Patientenplasmen sollte unter Einhaltung verschiedener Kautelen wie Zusatz von Aprotinin (zur Hemmung fibrinolytischer Aktivität) und Heparin (zur Hemmung von Thrombinaktivität) zum Zitratplasma durch die folgende Inkubation mit Spuren von $^{125}\text{-I}$ Fibrinogen nicht verfälscht werden.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten gelchromatographischen Untersuchungen wurden im Gegensatz zu denen von Fletcher und Alkjaersig (13), die 30×1 cm lange Biogel A - 5m - Säulen verwendeten, größer dimensionierte Säulen verwendet ($80 \times 2,6$ cm). Dies führte zu sehr langen Chromatographiezeiten, während denen es zu einer zunehmenden Erhöhung des Durchflußwiderstandes im Agarosegel kam. Dieser ließ sich am einfachsten nach Abschalten der Perfusionspumpe durch Messung der pro Zeiteinheit eluierten Flüssigkeit abschätzen, wenn über der Gelsäule ein Pufferreservoir mit konstantem Pufferniveau angebracht wurde. Der zunehmende Durchflußwiderstand wurde auf eine Retention von höhermolekularem Proteinmaterial im Gel zurückgeführt. Von dieser Retention dürften vor allem die hochmolekularen SFMC betroffen sein.

Nach Beendigung der Chromatographien wurden die Säulen mit geringen Mengen 5-molaren Harnstoffs durchgespült und dabei regelmäßig größere Mengen mit Trichloressigsäure fällbaren Proteinmaterial in der Waschflüssigkeit gefunden. Daß diese Retention von hochmolekularem Proteinmaterial zumindest teilweise von der im Elutionspuffer verwendeten Ionenstärke abhängig ist, läßt sich sehr gut demonstrieren, wenn man Plasmen, in welchen in vitro SFMC hergestellt wurden, bei z.B. 0,15 Mol, 0,4 Mol und 0,6 Mol NaCl-Zusatz zum Elutionspuffer chromatographiert.

Bei 0,15 Mol NaCl-Zusatz stieg der Durchflußwiderstand in der Säule stark an und es fanden sich fast keine SFMC im Ausschlußvolumen. Bei 0,4 Mol NaCl-Zusatz blieb der Durchflußwiderstand gering und es ließen sich größere Mengen SFMC im Ausschlußvolumen feststellen (Abb.7,8).

Bei 0,6 Mol konnten zwar immunologisch große Mengen an SFMC nachgewiesen werden, die jedoch trotz der vorhergehenden Inkubation nicht mit 125-J Fibrinogen markiert waren (Abb.9, Versuch). Demnach werden bei 0,15 Mol NaCl-Zusatz fast alle SFMC in dem Agarosegel retiniert und sind bei etwa 0,3 oder 0,4 Mol NaCl-Zusatz optimale Mengen an SFMC eluierbar.

Bei höheren Ionenstärken werden zwar ausreichende SFMC-Mengen eluiert, dabei scheint jedoch zum Teil Fibrinogen, bzw. nachträglich an diese Komplexe gebundenes 125-J Fibrinogen wieder zu dissoziieren. Aus diesem Grunde wurde bei allen Versuchen die von Fletcher und Alkjaersig (13) angegebene NaCl-Konzentration von 0,3 Mol im Elutionspuffer verwendet. Eine Retention von SFMC unter dieser Ionenstärke könnte sicherlich durch Verwendung kleiner dimensionierter Chromatographiesäulen und damit verbundener kürzerer Chromatographizeit verringert werden.

VII. Zusammenfassung

Der Nachweis von SFMC in Plasmen von Patienten mit subklinischer Verbrauchskoagulopathie oder klinisch noch nicht apparenter tiefer Venenthrombose ist für die rechtzeitige Diagnose dieser Krankheitsbilder von großer Wichtigkeit.

Von Fletcher und Alkjaersig wurde eine für die klinische Diagnostik brauchbare Methode angegeben, bei welcher die Patientenplasmen über Biogel A-5m chromatographiert werden und die SFMC anschließend in den frühen Fraktionen vor dem Fibrinogengipfel immunologisch nachgewiesen werden. Den immunologischen Methoden haftet allerdings der große Nachteil zeitlicher Aufwendigkeit an. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, SFMC in Patientenplasmen durch Inkubation mit $^{125}\text{-J}$ Fibrinogen zu markieren. Die zum Teil radioaktiv markierten SFMC können nach der Gelchromatographie sehr rasch semiquantitativ in einem Szintillationszähler bestimmt werden. Dadurch erhält man für dringende klinische Fragestellungen ein schnelles Zwischenergebnis, ohne daß eine nachfolgende genauere immunologische Bestimmung von SFMC beeinträchtigt würde.

Stabiles $^{125}\text{-J}$ Fibrinogen, das kein höhermolekulares Fibrinogenmaterial enthalten darf, ist für die Markierung von SFMC eine Voraussetzung und wird durch gelchromatographische Reinigung eines kommerziell hergestellten Fibrinogenpräparates bei hoher Ionenstärke gewonnen.

Aufgrund des vorliegenden Untersuchungsergebnisses scheint der Mechanismus einer Markierung von SFMC durch Inkubation mit radioaktivem Fibrinogen folgender zu sein: die aus Fibrinoligomeren und Fibrinogen aufgebauten SFMC scheinen, sofern das vom Patienten gewonnene Plasma sofort untersucht wird, bzw. die SFMC

wenn sie in vitro hergestellt werden und kurz danach mit 125-J Fibrinogen inkubiert werden, noch freie Bindungsstellen für die Kopolymerisation mit Fibrinogen zu besitzen. An diese freien Bindungsstellen dürfte sich das markierte Fibrinogen anlagern.

Ein Austausch von komplex an SFMC gebundenen und freiem Fibrinogen als Ursache der Markierbarkeit von SFMC durch Inkubation mit 125-J Fibrinogen, welcher in den Arbeiten von Jakobsen et al. diskutiert wird, ist den vorliegenden Untersuchungsergebnissen nach als wenig wahrscheinlich anzusehen.

VII.Literaturverzeichnis

- 1.Alkjaersig,N., Fletcher,A.P., and Burstein,R.:
Thromboembolism and oral contraceptive medication.
Thromb.diath.haem.suppl.II,125-131. 1971
- 2.Bang,N.U., and Chang,M.L.: Soluble fibrin complexes.
Seminars in thrombosis and hemostasis I,Nr.2,91-128. 1974
- 3.Bang,N.U., Hansen,M.S., Smith,G.F., Latallo,Z.S.,
Chang,M.L.,Mattler,L.E.: Molecular composition and
biological properties of soluble fibrin polymers
encountered in thrombotic states.
Ser.haem. 6, 494-512. 1973
- 4.Bang,N.U.,Hansen,M.S., Smith,G.F., Mosesson,M.W.:
Properties of soluble fibrin polymers encountered in
thrombotic states.
Thromb.diath.haemorrh.suppl. 56, 75-90. 1973
- 5.Belitser,V.A., Varetskaja,T.V., and Malneva,G.V.:
Fibrinogen-fibrin interaction.
Biochim.et biophys.acta 154, 367-375. 1968
- 6.Beller,F.K., Mitchell,P.S., and Gorstein,F.: Fibrin
deposition in the rabbit kidney produced by protease
inhibitors.
Thromb.diath.haem. 17, 472-439. 1967
- 7.Bleyl,U., Kuhn,W., und Graeff,H.: Retikuloendotheliale
Clearance intravaskulärer Fibrinmonomere in der Milz.
Thromb.diath.haem. 22, 87. 1968
- 8.Brooks,J., Davis,D., and DeVivo,G.:Blood hypercoagulability
in acute cerebrovascular syndromes: Its control with
urokinase therapy.
J.lab.clin.med. 76,879 (Abs) 1970

- 9.Carvalho,A.,Colman,R.W., and Lees,R.S.:Coagulation abnormalities in hyperbetalipoproteinemia and their modification with therapy.
J.clin.invest. 53, 15 a. 1974
- 10.Chaplin,H.,Alkjaersig,N., and Fletcher,A.P.:The pattern of coagulation changes accompanying sickle cell crisis.
Clin.res. 22, 450 a (Abs) 1974
- 11.Davis,R.B., Theologides,A., and Kennedy,B.J.:
Comparative studies of blood coagulation and platelet aggregation in patients with cancer and nonmalignant diseases.
Annals of internal medicine 71,Nr.1, 67-80.1969
- 12.Deutsch,E., und Lechner,K.: Die Klinik der manifesten generalisierten intravaskulären Gerinnung.
Verh.d.Dtsch.Arb.gem.f.Blutger.forschung anl.d.13.Tagung in Deidesheim vom 28.-29. März 1969.
Roka,L.(Hrsg),F.K.Schattauer Verlag Stuttgart-New York 1971
- 13.Fletcher,A.P., Alkjaersig,N.: Blood hypercoagulation, intravascular coagulation and thrombosis: New diagnostic concepts.
Thromb.diath.haem.suppl. XLV, 389 ff. 1970
- 14.Fletcher,A.P., Alkjaersig,N., Ghani,M., and Tulevski,V.:
Response of blood coagulation and plasma fibrinolytic enzyme system in acute myocardial infarction.
Clin.res.21, 862 (Abs) 1973
- 15.Gans,H., Stern,A., und Tan,B.H.: On the in vivo clearance of thrombin.
Thromb.diath.haem. 22,1 ff.1969
- 16.Godal,H.C., and Abilgaard,N.: Gelation of soluble fibrin in plasma by ethanol.
Scand.j.haem. 3, 343 ff. 1966
- 17.Godal,H.C., Abilgaard,U., Kierulf,P.: Ethanol gelation and fibrinmonomer in plasma.
Scand.j.haem.suppl. 13, 189 ff. 1971

18. Godal, H.C., and Kierulf, P.: Precipitation of fibrinogen-derived materials by protamine.
Scand.J.haem.suppl. 13, 163 ff.1971
19. Good, R.A., Thomas, R.L.: Studies on the generalized Shwartzman reaction.
J.exp.med. 97, 871 ff. 1953
20. Graeff, H., von Hugo, R., und Hafter, R.: In vivo formation of soluble fibrin monomer complexes in human plasma.
Thromb.res. 3, 465-476. 1973
21. Graeff, H., von Hugo, R., Kuhn, W., Scholz, H., Ernst, A., and Gastroph, R.: Fibrinogen derivatives with a higher molecular weight than that of the parent molecule in cord vein plasma of newborns. I. Identification in single plasma samples.
Klin.Wschr. 51, 695-698. 1973
22. Gurewich, V., and Hutchinson, E.: Detection of intravascular coagulation by a serial dilution protamine sulfate test.
Ann.int.med. 75, 895 ff.1971
23. Gurewich, V., Lipinski, B., Lipinska, J.: A comparative study of precipitation and paracoagulation by protamine sulfate and ethanol gelation.
Thromb.res. 6, 539 ff.1973
24. Heene, D.L.: Zur Diagnostik der Verbrauchskoagulopathie.
Bibl.haem. 32, 257 ff. 1970
25. Heene, D.L.: Zur Differentialdiagnose zwischen primärer und sekundärer Fibrinolysesteigerung.
Fol.Haemat.94, 186 ff.
26. von Hugo, R., and Graeff, H.: Fibrinogen derivatives with a higher molecular weight than that of the parent molecule in cord vein plasma of newborns. II. Further characterization from pooled Plasma.
Klin.Wschr. 51, 699-702. 1973

- 27.Huth,K.: Klinik und Therapie der Verbrauchskoagulopathie.
Bibl.haemat. 32,281 ff. 1970
- 28.Jakobsen,E., Ly,B., and Kierulf,P.: Incorporation of fibrinogen into soluble fibrin complexes.
Thromb. res. 4, 499-507. 1974
- 29.Kaboth,W., und Begemann,H.: Blut.
Gauer,Kramer,Jung (Hrsg): Physiologie des Menschen.
Verlag Urban und Schwarzenberg,München , 103. 1971
- 30.Kudryk,B., Reuterby,J., Blombäck,B.: Adsorption of plasminic fragment D to thrombin modified fibrinogen-sepharose.
Thromb.res. 2, 297 ff.1973
- 31.Lasch,H.G.: Zur Pathophysiologie und Klinik der Verbrauchskoagulopathie.
Fol.haemat.(Sonderdruck) 97, 71- 83. 1972
- 32.Lasch,H.G., Heene,D.L., Huth,K, and Sandritter,W.:
Pathophysiology,clinical manifestations and therapy of consumption-coagulopathy ("Verbrauchskoagulopathie").
Amer.j.card. 20, 381 ff.1967
- 33.Lasch,H.G., Roka,L., Heene,D.L.: Experimental intravascular clotting.
Koller Duckert Streuli (Eds):Pathogenesis and treatment of thromboembolic diseases.
F.K.Schattauer Verlag 1965
- 34.Lechner,K., Regele,H., Waldhäusl,W., und Karobath,H.:
Verbrauchskoagulopathie bei metastasierendem Prostatakarzinom.
Acta haemat. 40,95 ff.1968
- 35.Lipinski,B., Wegrzynowicz,Z., Budzynski,A.Z., Kopec,M., Latallo,Z.S.,and Kowalski,E.: Soluble inelotable complexes formed in the presence of fibrinogen degradation products (FDP) during the fibrinogen-fibrin conversion and their potential significance in pathology.
Thromb.diath.haem. 17, 65-67. 1967

36. Lipinski, B., Worowski, K., Jeljaszewicz, S., Niewarowski, S.,
Rejnick, L.: Participation of soluble fibrin monomer
complexes and platelet factor 4 in the generalized
Shwartzman reactio.
Thromb. diath. haem 20, 285 ff. 1968
37. Ly, B., Kierulf, P., and Jakobsen, E.: Stabilization of
soluble fibrin/fibrinogen complexes by fibrin stabilizing
factor (FSF).
Thromb. res. 4, 509-522. 1974
38. Mammen, E. F.: Physiology and biochemistry of blood coagulation.
Bang Beller Deutsch Mammen (Eds): Thrombosis and bleeding
disorders, theory and methods.
Thieme Verlag Stuttgart, Academic press N.Y.-London
39. Marder, V. J., Shulman, N. R.: High molecular weight derivatives
of human fibrinogen produced by plasmin.
J. biol. chem. 244, 2120-2124. 1969
40. Mathias, F. R., Heene, D. L., Konradi, E.: Behavior of fibrinogen
and fibrinogen degradation products (FDP) towards insoluble
fibrinogen and fibrin monomer.
Thromb. res. 3, 657-664. 1973
41. Marx, R.: Über thrombophile und hämorrhagische Diathesen
bei Krebs.
Deutsch Fischer Lechner (Hrsg): Verh. d. Dtsch. Arb. gem.
f. Blutgerinnungsforschung anl. d. 11. Tagung in Wien
v. 14.-15. April 1967
F. K. Schattauer Verlag 1967
42. Merskey, C., Lalezari, P., and Johnson, A. J.: A rapid, simple
sensitive method for measuring fibrinolytic split products
in human serum.
Proc. soc. exp. med. biol. 81, 871 ff. 1969

43. Müller-Berghaus, G.: Pathophysiology of disseminated intravascular coagulation.
Mammen Anderson Barnhart (Eds): Disseminated intravascular coagulation. F.K. Schattauer Verlag Stuttgart-N.Y., 45 ff. 1969
44. Müller-Berghaus, G.: Zur Pathophysiologie der Verbrauchskoagulopathie.
Bibl. haemat. 32, 257 ff. 1970
45. Müller-Berghaus, G., and Heinrich, D.: Fibrin monomer and platelet aggregation in vitro and in vivo.
Brit. j. haemat. 23, 177 ff. 1972
46. Müller-Bergaus, G., Koka, L., Lasch, H.G.: Fibrinmonomere und das Sanarelli Shwartzman Phänomen.
Schlegel (Hrsg): Verh. d. Dtsch. Gesellschaft f. Innere Medizin. 77. Kongress gehalten zu Wiesbaden vom 19.-22. 4. 1971
J.F. Bergmann Verlag München. 161-163. 1971
47. Nossel, H.L., Younger, L.R., Wilner, G.D., Procupez, T.L., Canfield R.E., Butler jr., V.: Radioimmunoassay of human fibrinopeptide A.
Proc. nat. acad. sci. USA 68, 2350-2353. 1971
48. Nossel, H.L., Chapter, R., Butler, V.P., Canfield, R.: Radioimmunoassay of human fibrinopeptide B.
Blood 40, 955 ff. 1972
49. Owen, C.A. jr., Oels, H.C., Bowie, E.J., Didisheim, P., and Thompson, J.H. jr.: Chronic intravascular coagulation syndrome (ICS).
Mammen Anderson Barnhart (Eds): Disseminated intravascular coagulation.
F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart-N.Y. 197 ff. 1969
50. Pitney, W.R.: Disseminated intravascular coagulation.
Miescher and Jaffe (Eds): Seminars in hematology 8 Nr. 1, 65 ff. 1971
51. Peck, S.D., and Reiquam, C.W.: Disseminated intravascular coagulation in cancer patients: supportive evidence.
Cancer 31, 1114-1119. 1973

52. Reeve, E.B., and Franks, J.J.: Fibrinogen synthesis, distribution and degradation.
Seminars in thromb. and hemost. 1, Nr.2, 129-183. 1974
53. Sasaki, T., Page, I.H., Shainoff, J.R.: Stable complex of fibrinogen and fibrin.
Science 152, 1069-1071. 1966
54. Shainoff, J.R., and Page, I.H.: Significance of cryoprotein fibrin in fibrinogen-fibrin conversion.
J.exp.med. 116, 687-707. 1962
55. Shainoff, J.R., Page, I.H.: Cofibrins and fibrin intermediates as indicators of thrombin activity in vivo.
Circ. res. 8, 1013-1022. 1960
56. Sherman, L.A.: Fibrinogen turnover: demonstration of multiple pathways of catabolism.
J.lab.clin.med. 79, 710-723. 1972
57. Sigg, P.E., und Duckert, F.: Ein neuer Test zur Bestimmung des fibrinstabilisierenden Faktors (FSF).
Schweiz.med.Wschr. 93, 1455-1456. 1963
58. Smith, G.F., and Bang, N.U.: Formation of soluble fibrin polymers. Fibrinogen degradation products fail to form soluble complexes with fibrin monomer.
Biochemistry 11, 2958-2966. 1972
59. Stormshen and Owren, P.A.: Physiopathology of hemostasis.
Sem.in hemat. 8 Nr.1, 3 ff. 1971
60. Thomas, L., Smith, R.T., von Korff, R.: Cold-precipitation by heparin of a protein in rabbit and human plasma.
Proc.soc.exp.biol.med. 86, 813-818. 1954
61. Vermeylen, J., Donati, M.B., and Verstraete, M.: The identification of fibrinogen derivatives in plasma and serum by agarose gel filtration.
Scand.j.haem.suppl. 13, 165 ff. 1971

62. Walsh, R.T., and Barnhart, M.J.: Clearance of coagulation and fibrinolysis products by the reticuloendothelial system.

Mammen Anderson Barnhart (Eds): Disseminated intravascular coagulation.

F.K.Schattauer Verlag, Stuttgart-N.Y. 83 ff. 1969

63. Wegrzynowicz, Z., Kopec, M., Latello, Z.S.: Formation of soluble fibrin complexes and some factors affecting their solubility.

Scand. j. haemat. suppl. 13, 49 ff. 1971

Lebenslauf

- 1950, 2.Februar: geboren in Köln
- 1956, Ostern: Eintritt in die Volksschule Köln, Friesenstr.
- 1960, Ostern: Übertritt in das Städtische Mädchengymnasium
Köln-Mülheim, sozialwissenschaftlicher Zweig
- 1968, 30.Mai: Abitur
- 1968, Wintersemester: Aufnahme des Psychologiestudiums
an der Universität zu Köln
- 1969, Sommersemester: Beginn des Medizinstudiums an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
- 1972, Wintersemester: Weiterführung des Medizinstudiums
an der Universität Wien
- 1973, März: Beginn des experimentellen Teils der Dissertation
- 1973, Wintersemester: Fortsetzung des Studiums an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
- 1975, 31.Juli: Abschluß des Medizinischen Staatsexamens
- 1975, 1.-31.12.: Beginn der Medizinalassistentenzeit bei
Prof.Dr.Begemann, Krankenhaus München-Schwabing,
I.Med.Abteilung
- 1976, 1.1.-30.4.: Kreiskrankenhaus Erding, Chirurgische Abt.,
Dr.Jakob
- 1976, 1.5.-31.8.: Medizinische Poliklinik der Universität
München, Prof.Dr.Zöllner
- 1976, 1.9.-28.2.77: Krankenhaus München Schwabing,
II.Kinderabteilung, Dr.Schweier

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Herrn Professor Dr.E.Deutsch, der mir das Thema überließ, und Herrn Professor Dr.K.Lechner für seine unbürokratische und herzliche Art der Hilfestellung.

Meinen Dank aussprechen möchte ich ferner Herrn Dr.E.Thaler, der das praktische Gelingen der Versuche ermöglichte und über auftauchende theoretische Unklarheiten hinweghalf.

